

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/53, 15/52, 15/82</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/38566</b> (43) Date de publication internationale: 5 décembre 1996 (05.12.96)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00820 (22) Date de dépôt international: 31 mai 1996 (31.05.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/06466 31 mai 1995 (31.05.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 145, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MARIN, Elena [FR/FR]; 4, rue du Jardin-Neuf, F-91580 Saudreville (FR). MARION-POLL, Annie [FR/FR]; 78, rue Francisco-Ferrer, F-78210 Saint-Cyr-L'Ecole (FR). (74) Mandataire: CABINET REGIMBEAU; 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, BG, BR, CA, HU, NO, RO, RU, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: NUCLEIC ACID FRAGMENT CODING FOR AN ENZYME INVOLVED IN THE ABSCISIC ACID (ABA) BIOSYNTHESIS PATHWAY IN PLANTS (54) Titre: FRAGMENT D'ACIDE NUCLEIQUE CODANT POUR UN ENZYME IMPLIQUE DANS LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE L'ACIDE ABSCISSIQUE (ABA) CHEZ LES PLANTES (57) Abstract A nucleic acid fragment coding for an enzyme involved in the abscisic acid (ABA) biosynthesis pathway in plants is described. (57) Abrégé La présente invention concerne un fragment d'acide nucléique codant pour un enzyme impliqué dans la voie de biosynthèse de l'acide abscissique (ABA) chez les plantes.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Biélorus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**"FRAGMENT D'ACIDE NUCLEIQUE CODANT POUR UN ENZYME  
IMPLIQUE DANS LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE L'ACIDE  
ABSCISSIQUE (ABA) CHEZ LES PLANTES"**

La présente invention concerne le clonage d'un gène impliqué dans la voie de biosynthèse de l'acide abscissique (ABA) dans les plantes.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un  
5 fragment d'acide nucléique isolé codant pour une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de l'ABA.

L'acide abscissique (ABA) est considéré comme une "hormone de stress" végétale parce qu'il est accumulé lorsque les plantes sont soumises  
10 à des stress divers tels que sols salins, faibles températures, gel et sécheresse. L'ABA induit des réponses au niveau de la plante hôte qui augmentent la tolérance au stress. La teneur en eau des tissus végétaux et le fonctionnement des stomates sont régulées par l'ABA (Tal et Nevo, 1973). L'ABA commande également les aspects de dormance et de germination des  
15 graines (Koornneef et al., 1982, 1989), et favorise une embryogenèse normale et une formation de protéines stockées dans les graines (se reporter à Kermode, 1990).

Malgré son importance capitale pour les plantes, la physiologie de  
20 l'ABA est encore mal comprise. La majorité des informations concernant la physiologie de l'ABA et son rôle a été fournie par l'analyse de mutants affectés dans la synthèse ou dans la réponse induite par l'ABA (Zeevaart et Creelman, 1988). Les données moléculaires obtenues jusqu'ici concernent seulement des gènes impliqués dans le signal de transduction de l'ABA. Des  
25 mutants au niveau du locus viviparous-1 du maïs (vpl) présentent une sensibilité réduite à l'ABA (Robichaud et al., 1980). Le gène vpl, cloné par étiquetage par un transposon (McCarty et al., 1989), code pour un activateur transcriptionnel VP1. Les mutants d'Arabidopsis insensibles à l'ABA (abi) ont été sélectionnés grâce à leur capacité à germer sur de  
30 fortes concentrations d'ABA (Koornneef et al., 1984). Les gènes abi1 et abi3 ont été isolés par un clonage positionnel encore appelé méthode de

marche sur le chromosome (Leung et al., 1994; Meyer et al., 1994; Giraudat et al., 1992). Le gène abi1 code pour une phosphatase régulée par le calcium, alors qu'abi3 code pour une protéine homologue à VP1 .

5 Des études biochimiques de mutants déficients en ABA ont permis l'élucidation de la voie de biosynthèse de l'ABA. La biosynthèse de l'ABA chez les plantes supérieures se réalise via une voie de synthèse C40, dénommée "indirecte", voie de synthèse qui dérive des caroténoïdes (Zeevaart et Creelman, 1988; Gage et al., 1989). Une preuve récente indique  
10 que le précurseur de type xanthophylle de l'ABA est la 9'-cis-néoxanthine, qui est formée à partir de la trans-violaxanthine (Li et Walton, 1989; Parry et al., 1990). Des mutants présentant des taux d'ABA réduits ont été sélectionnés sur la base de leur dormance de graine réduite ou de leur phénotype de flétrissement. Les mutants viviparous du maïs vp-2, vp-5,  
15 vp-7 et vp-9 sont déficients en ABA et sont bloqués de manière simultanée dans les stades précoces de la biosynthèse des caroténoïdes. En conséquence, ils présentent un photo-blanchiment, dû au manque de protection des appareils photosynthétiques par les caroténoïdes (Moore et Smith, 1985; Neil et al., 1986). Le mutant aba d'Arabidopsis thaliana  
20 présente une déficience au niveau de l'époxydation de la zéaxanthine (Duckham et al., 1991; Rock et Zeevaart, 1991) qui est considérée comme la première étape de la biosynthèse de l'ABA (Taylor, 1991). Plusieurs mutants isolés chez la tomate (flacca et sitiens), la pomme de terre (droopy), l'orge (nar2a) ou chez Nicotiana glauca (ab1)  
25 présentent une déficience au niveau de la dernière étape de la voie de synthèse (pour revue voir Taylor, 1991) : l'oxydation de l'aldéhyde-ABA en ABA (Linthorn et al., 1987). Finalement, le mutant wilty du pois (Duckham et al., 1989) et le mutant notabilis de la tomate (Taylor et al., 1988) sont probablement affectés dans une des autres étapes de la voie de biosynthèse  
30 (Taylor, 1991). Malgré un progrès considérable dans l'élucidation des étapes biochimiques de la voie de biosynthèse de l'ABA, aucun gène de cette voie de synthèse n'a pu être cloné jusqu'à maintenant.

Le but de la présente invention est l'isolement d'un gène de la voie  
35 de biosynthèse de l'ABA.

Compte-tenu du rôle physiologique de l'ABA au niveau du développement, de la tolérance des plantes au stress, de la dormance ou de la maturation des graines, un gène de la voie de biosynthèse de l'ABA peut être utilisé pour contrôler ou modifier la synthèse de l'ABA dans des  
5 plantes transgéniques.

Comme la productivité des plantes est fortement affectée par les stress environnementaux, l'amélioration génétique d'une tolérance au stress est une des tâches les plus importantes en agriculture. Une  
10 surproduction d'ABA, à l'aide d'un promoteur inductible, peut accélérer la réponse d'une plante vis-à-vis d'un stress environnemental. Par exemple, la transformation de certaines plantes tropicales avec un gène de la biosynthèse de l'ABA sous la commande d'un promoteur pouvant être induit par le froid peut aboutir à une meilleure adaptation à des climats  
15 froids. Une autre application importante de la modification génétique de la biosynthèse de l'ABA est la création de plantes transgéniques ayant une dormance de graine réduite par diminution des niveaux en ABA dans les graines matures. Ceci peut être réalisé par l'introduction d'un gène anti-sens de la biosynthèse de l'ABA, sous la commande d'un promoteur  
20 spécifique aux graines. Dans cette stratégie, il est essentiel d'assurer un stockage protéique et lipidique correct dans les graines, pour garantir un bon développement des futures plantes.

La présente invention fournit pour la première fois l'isolement et  
25 la caractérisation moléculaire d'un gène de la voie de biosynthèse de l'ABA. Un nouveau mutant déficient en ABA (appelé aba2) a été isolé par une mutagenèse d'insertion induite par un élément transposable Ac dans Nicotiana plumbaginifolia. L'intérêt essentiel de ce mutant est que le gène de la voie de biosynthèse de l'ABA y est étiqueté car la mutation, cause de  
30 déficience en ABA est due à l'insertion de l'élément Ac. L'analyse de l'ADNc correspondant indique que celui-ci code pour une époxydase de la zéaxanthine. Cette époxydase est originale et le contrôle de son expression est déterminant car elle catalyse vraisemblablement les deux premières étapes de la biosynthèse de l'ABA.

Les expériences d'étiquetage de gène, à l'aide de mutation par insertion d'éléments transposables, quelle que soit l'espèce, sont totalement aléatoires et peuvent prendre plusieurs années. En effet, il faut obtenir des transformants primaires (2 à 6 mois selon les espèces), puis  
5 obtenir leurs descendants jusqu'à la quatrième génération pour obtenir éventuellement un mutant et le caractériser génétiquement. Le temps de génération varie selon les espèces de 6 semaines chez Arabidopsis à 4 mois chez Nicotiana plumbaginifolia.

10 Par ailleurs, ces expériences doivent être menées sur une grande quantité de plantes pour espérer isoler un mutant donné. Le génome d'Arabidopsis est estimé à 100 Mégabases, celui de N. plumbaginifolia est estimé à 1000 Mégabases. La séquence transcrite du gène isolé mesure environ 2 Kilobases. Les insertions dans les introns ne donnent en  
15 général pas de mutation détectable. On peut donc estimer qu'il serait nécessaire de tester la descendance d'environ 50 000 plantes pour Arabidopsis et 500 000 plantes chez N. plumbaginifolia, ayant subi un événement de transposition. Ceci représente un travail et une surface de serre impossibles à réaliser de façon systématique.

20 Il était connu un mutant d'Arabidopsis thaliana déficient en ABA mais le gène n'était pas étiqueté de sorte qu'il n'avait jamais pu être isolé.

La méthode dite de clonage positionnel ou encore de marche sur le  
25 chromosome ne pouvait permettre d'isoler de façon évidente un tel gène à partir du mutant de biosynthèse de l'ABA chez cette espèce. La marche sur le chromosome nécessite en effet, de disposer de marqueurs (RAPD, AFLP...) à proximité (environ 200 Kilobases) du gène à cloner et d'une banque de YACS ou de cosmides. Une fois le gène localisé sur un cosmide ou  
30 un YAC, il s'agit de transformer le mutant avec des fragments de ce clone jusqu'à trouver le gène correspondant. L'ensemble de ces expériences nécessite plusieurs années de travail. Seulement quelques gènes ont été clonés par cette technique à ce jour, alors que plusieurs centaines de mutants ont été identifiés chez Arabidopsis. C'est pourquoi, bien que le  
35 mutant déficient en acide abscissique ait été isolé en 1982 chez Arabidopsis le gène correspondant n'a toujours pas été cloné par cette technique.

La présente invention a donc pour objet un fragment d'acide nucléique isolé codant pour un enzyme impliqué dans la voie de biosynthèse de l'acide abscissique (ABA) chez les plantes.

5 Plus particulièrement, l'enzyme est une époxydase impliquée dans les deux premières étapes de la voie de biosynthèse de l'ABA. Plus particulièrement encore, l'enzyme présente une activité d'époxydation de la zéaxanthine.

10 Dans un mode de réalisation préféré, la présente invention a pour objet un fragment d'acide nucléique isolé, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence de nucléotides telle que montrée dans l'identificateur de séquence N° 1, ou tout ou partie d'une séquence  
15 homologue à celle montrée dans l'identificateur de séquence N° 1, ou tout ou partie d'une séquence complémentaire de ladite séquence de l'identificateur de séquence N° 1 ou d'une séquence homologue.

Par "fragment d'acide nucléique", on entend ici un polymère de nucléotides pouvant être de type ADN ou ARN. Ces termes sont définis dans  
20 tous les ouvrages de base de biologie moléculaire. Préférentiellement, un fragment d'acide nucléique selon l'invention est un fragment d'ADN double brin.

Le terme "partie" désigne un fragment comportant une portion  
25 d'au moins 500 de préférence au moins 1000 nucléotides identiques à une portion d'une longueur équivalente de la séquence nucléotidique indiquée dans l'identificateur de séquence (IDS N° 1) ou de son complémentaire.

Le terme "homologue" fait référence à tout acide nucléique  
30 présentant une ou plusieurs modification(s) de séquence par rapport à tout ou partie de la séquence montrée dans l'IDS N° 1, et codant pour un enzyme ayant l'activité mentionnée ci-dessus.

Ces modifications peuvent être obtenues par mutations, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotide(s) par rapport à la séquence native. Elles peuvent être introduites notamment pour améliorer l'activité de l'enzyme. Dans ce contexte, on préférera un degré d'homologie de 70 %  
5 par rapport à la séquence native, avantageusement de 80 % et, de préférence, de 90 %. L'homme du métier sait où effectuer les modifications afin de ne pas altérer de manière drastique la fonction de l'enzyme et connaît également les techniques permettant d'évaluer si l'homologue généré a l'activité enzymatique, par exemple par insertion en amont d'un  
10 gène reporter dont l'expression est facilement détectable ( $\beta$ -galactosidase, cathéchol-oxygénase, luciférase ou encore un gène conférant la résistance à un antibiotique). Mais tout autre technique conventionnelle peut également être employée.

15 La séquence de l'IDS N° 1 est une séquence isolée du mutant aba2 décrit ci-après. Il s'agit de la séquence d'ADNc c'est-à-dire dépourvue des introns.

De préférence, le fragment selon l'invention comprend tout ou  
20 partie de la séquence codante allant du nucléotide n° 41 à 2029, de l'IDS/41 N°1, ou son complémentaire, ou d'une séquence homologue ou complémentaire de ladite séquence homologue.

De façon avantageuse, le fragment selon l'invention comporte en  
25 outre la séquence leader allant du nucléotide n° 1 à 40 de l'IDS N° 1.

De même, le fragment selon l'invention comporte de façon  
avantageuse, la séquence de terminaison allant du nucléotide 2030 à 2400  
de l'IDS N° 1.

30

De façon classique, il comporte ladite séquence de terminaison augmentée d'une queue poly A à son extrémité 3'.

Selon une variante encore préférée, le fragment selon l'invention  
35 comprend la séquence complète de 2400 nucléotides telle que montrée sur l'IDS N° 1, une séquence homologue, une séquence complémentaire, ou une séquence homologue à ladite séquence complémentaire.



L'invention inclut également toute séquence capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec une de ces séquences et codant pour une même activité enzymatique impliquée dans la voie de biosynthèse de l'ABA, notamment dans les deux premières étapes.

5

La présente invention a pour objet un vecteur de clonage caractérisé en ce qu'il comporte un fragment d'acide nucléique selon la présente invention.

10

Dans un mode de réalisation, un vecteur de clonage comporte une séquence codante complète de 2400 nucléotides telle que représentée dans l'IDS N° 1.

15

Il doit être bien entendu que l'invention a également pour objet toute séquence d'ADN équivalente, c'est-à-dire qui diffère des séquences mentionnées ci-dessus seulement par une ou plusieurs mutations neutres, c'est-à-dire dont le changement ou la substitution de nucléotides en cause n'affecte pas la séquence primaire de la protéine résultante.

20

A titre de vecteur de clonage comprenant le fragment, on peut citer les vecteurs comprenant une séquence d'ADN contenant au moins une origine de réplication telle que des plasmides, des cosmides, des bactériophages, des virus etc. On utilisera de préférence toutefois, des plasmides.

25

De préférence le fragment d'ADN selon l'invention sera associé à une séquence régulatrice appropriée pour sa transcription et sa traduction (ci-après régulon) tels que des promoteurs, y compris des codons start et stop, des "enhancer", des opérateurs. Les moyens et méthodes pour identifier et sélectionner ces promoteurs sont bien connus de l'homme du métier.

30

Les fragments d'ADN selon l'invention peuvent être introduits dans des cellules de plantes selon des mécanismes connus tels que par l'intermédiaire du plasmide Ti d'Agrobacterium tumefaciens, ou par transferts directs de gènes tels que par la méthode d'électroporation. On  
5 pourra utiliser avantageusement dans ce cas, mais non obligatoirement, le régulon constitutif du gène correspondant.

Alternativement, les fragments d'ADN selon l'invention peuvent être utilisés pour transformer des micro organismes ou des cellules  
10 eukaryotiques pour cloner et produire l'enzyme Epoxydase correspondant.

La présente invention permet enfin d'améliorer la résistance au stress des plantes, en introduisant dans les cellules desdites plantes un fragment d'ADN codant selon l'invention, dans des conditions permettant  
15 sa réplication et son expression.

Les procédés de génie génétique qui permettent de bloquer l'expression d'un gène dans une plante, sont connus.

20 Ainsi, l'expression du gène peut être bloquée par hybridation de l'ARNm transcrit par ledit gène avec un fragment d'ARN complémentaire d'au moins une partie de l'ARNm transcrit par l'un desdits gènes.

Ledit fragment d'ARN complémentaire d'au moins une partie de  
25 l'ARNm transcrit par l'un desdits gènes peut être introduit tel quel dans les cellules de plantes à transformer ou sous forme d'un fragment d'ADN placé sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel, de sorte que la transcription dudit fragment d'ADN fournisse une séquence d'ARN complémentaire d'au moins une partie de l'ARNm transcrit par le gène.

30 On peut introduire dans les cellules d'une plante, un plasmide contenant un fragment d'ADN exogène placé sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel, de sorte que la transcription dudit fragment d'ADN fournisse une séquence d'ARN complémentaire d'au moins une  
35 partie de l'ARNm endogène transcrit par le gène.

On peut aussi se contenter d'agir sur la régulation du gène endogène de l'enzyme en modifiant les gènes de régulation qui contribuent à son expression de manière à ce qu'ils induisent un blocage de l'expression de l'enzyme endogène du fait de ces modifications.

5

De façon appropriée, ledit fragment d'ADN exogène code pour une séquence d'ARN complémentaire d'une partie de l'ARNm transcrit par le gène comportant le site de liaison au ribosome et/ou le site d'initiation de la traduction.

10

Le gène exogène est en général un gène hétérologue, c'est-à-dire qui provient d'une plante, d'une espèce différente de la cellule hôte, le gène codant pour l'enzyme ordinairement non produit par la plante dans le génome de laquelle il est introduit.

15

Le gène exogène introduit dans le génome de la plante peut aussi être un gène homologue au gène endogène, c'est-à-dire dont l'expression produit l'enzyme ordinairement produite par la plante.

20

De façon appropriée, ledit fragment d'ADN exogène code pour une séquence d'ARN complémentaire de plus de 80 % de l'ARNm par l'un des gènes précités.

25

Ledit fragment d'ADN exogène peut être un fragment d'un des gènes fonctionnels codant pour une enzyme précitée, ce fragment étant placé en sens inverse du gène endogène par rapport au promoteur, de sorte que la transcription dudit fragment de gène inversé se produit dans un sens inverse au sens de transcription du gène pour s'hybrider à l'ARNm endogène dudit gène et en bloquer l'expression.

30

On entend par "gène fonctionnel codant pour l'enzyme" une séquence d'ADN qui peut donc être plus courte ou plus longue que la séquence codante totale, du gène complet de l'enzyme. En particulier, le "gène fonctionnel" pourra correspondre à une séquence codante dépourvue des introns.

35

On peut aussi pour introduire un fragment d'ARNm ou d'ADN dans la plante, mettre en oeuvre tout d'abord les méthodes de transfert direct de gènes connues de l'homme de l'art, telles que la micro-injection directe dans des cellules d'embryon ou encore la précipitation directe au moyen de EPG ou le bombardement par canon de particules ou par infection avec une souche bactérienne dans laquelle le fragment d'acides nucléiques a été introduit.

On peut aussi infecter la plante par une souche bactérienne, notamment d'Agrobacterium tumefaciens selon une méthode éprouvée (Schell et van Montagu, 1983) ou d'Agrobacterium rhizogenes, notamment pour les espèces récalcitrantes à la transformation (Chilton et al., 1982). La souche bactérienne comportera ledit fragment d'ADN codant pour l'enzyme sous le contrôle d'éléments assurant la transcription en ARNm dudit gène. La souche pourra être transformée par un vecteur dans lequel est inséré le gène codant l'enzyme sous le contrôle d'éléments assurant la transcription dudit gène. Ce gène sera inséré par exemple dans un vecteur binaire tel que pBIN19 (Bevan, 1984) ou pMON 505 (Horsch et Klee, 1986) ou tout autre vecteur binaire dérivé des plasmides T1 et Ri. Il pourra aussi être utilement introduit par recombinaison homologue dans un plasmide T1 ou Ri désarmé, tel que pGV 3850 (Zambryski et al., 1983) avant la transformation de la plante.

D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée qui va suivre faite en référence aux figures dans lesquelles :

La figure 1 représente l'effet de la dessiccation sur le poids de feuilles détachées de type sauvage et du mutant AA67 (aba2) de *Nicotiana Plumbaginifolia*. Les feuilles ont été récoltées, séchées doucement sur un papier de type absorbant et pesées toutes les 5 min. dans l'atmosphère desséchante d'une hotte à flux laminaire. La moyenne et l'erreur standard de six expériences indépendantes sont indiquées.

La figure 2 représente le profil en caroténoïdes de feuilles de type sauvage et du mutant AA67 (aba2).

La figure 3 représente le schéma de biosynthèse de l'ABA à partir de la zéaxanthine. Adaptée à partir de la voie de synthèse proposée par Li et Walton (1990) et Parry et al. (1990).

La figure 4 représente l'analyse de Southern de l'ADN de la descendance mutante et sauvage de la plante mutante AA67 (aba2), portant un élément trAc. L'ADN digéré par EcoRI a été hybridé à la sonde A (sur le bord 5' de Ac). R<sub>0</sub> indique le transformant primaire; R<sub>1</sub>, la plante AA67 parentale; M1 à M3, la descendance mutante R<sub>2</sub>; N1 à N5, les plantes R<sub>2</sub> ayant un phénotype sauvage; p indique la proportion de mutants dans la descendance de chaque plante.

15

La figure 5 représente la carte de restriction partielle du locus muté par l'insertion de Ac. Les positions des sondes correspondant à Ac et à l'ADN adjacent sont indiquées par des barres A, B et C.

La figure 6 représente l'analyse de northern de l'ARN de feuilles de type sauvage et du mutant aba2 hybridé avec la sonde C (figure 3B) et avec la sonde  $\beta$ ATPase.

La figure 7 représente l'analyse de Southern de l'ADN de plantes révertantes dans la descendance d'une plante mutante homozygote. La digestion a été réalisée par EcoRV et l'hybridation avec la sonde C (figure 5). Les pistes sont les suivantes : WT, type sauvage; R<sub>1</sub>, plante AA67 parentale; R<sub>2</sub>, une plante R<sub>2</sub> hétérozygote; lignes 1 à 5 sont les plantes révertantes de la descendance R<sub>3</sub> d'une plante mutante R<sub>2</sub> homozygote; M4 et M5, deux plantes mutantes R<sub>2</sub> homozygotes.

La figure 8 représente la séquence de l'ADNc complet avec la séquence d'acides aminés déduite pour le plus grand ORF démarrant par une méthionine. Le premier codon d'initiation et le codon stop sont indiqués en caractères gras. La séquence de 8 pb dupliquée dans le locus génomique après l'insertion de Ac est encadrée.

La figure 9 représente les trois domaines d'homologie significative de la protéine sont représentés. Le motif de liaison à l'ADP (a), le motif central de fonction inconnue (b) et le motif de liaison au FAD (c). Les positions des acides aminés sont indiquées entre parenthèses.

5 Abréviations: (-) n'importe quel résidu; (w) Y, W, F (acides aminés ayant un groupe aromatique); (x) K, R, H, S, T, Q, N (acides aminés basiques ou hydrophiles); (y) A, I, L, V, M, C (acides aminés petits et hydrophobes); (z) D, E (acides aminés acides); (#) inégalités de la séquence de l'époxydase; (Epoxy.) époxydase supposée de la zéaxanthine de Nicotiana

10 plumbaginifolia.

La Figure 10 représente les études d'import dans les chloroplastes des produits de traduction du cDNA. La piste 1 est chargée des marqueurs de poids moléculaire, T est chargé avec un microlitre de mélange de traduction, C est chargé avec la réaction d'import (correspondant à 1/4 du total de la réaction de l'import), P est chargé avec la réaction de l'import après traitement protéasique (correspondant à 1/4 de la réaction de l'import).

-15

20 Les abréviations suivantes sont utilisées ci-après

"ABA" pour acide abscissique ; "ABA-GE" pour ester de l'ABA-glucose ; "pb" pour paires de bases ; "DW" pour poids sec ; "FW" pour poids frais ; "HPLC" pour chromatographie liquide haute-pression ; "nt"

25 pour nucléotide (s) ; "ORF" pour cadre de lecture ouvert.

1. Isolement d'un mutant déficient en ABA dans une lignée de Nicotiana plumbaginifolia portant un élément transposable Ac

30 L'élément transposable du maïs Ac, inséré dans la séquence d'un marqueur de résistance à la kanamycine (Baker et al., 1987) a été introduit via une transformation par Agrobacterium dans N. plumbaginifolia, donnant naissance à des transformants primaires R<sub>0</sub> (Marion-Poll et al., 1993).

35

### 1.1. Matériel et méthode

Des plantes transgéniques de Nicotiana plumbaginifolia cv. viviani ont été obtenues par transformation avec la construction pGV 3850 Hygro:pKU 3Ti (Baker et al., 1987) et caractérisées comme précédemment décrit (Marion-Poll et al., 1993).

Le criblage des phénotypes mutants a été réalisé en utilisant des graines stérilisées en surface, étalées sur un milieu BNO<sub>3</sub> (Gabard et al., 1987). Pour favoriser une germination uniforme, les graines ont été placées pendant 10 à 20 jours dans une chambre de germination ayant une différence importante au niveau des températures jour/nuit (25°/17°C) et des jours courts (8 h/16 h). Les boîtes contenant de jeunes plantules ont été transférées dans une chambre de croissance (16 h de jour/8 h de nuit et 25°C) pour permettre une croissance plus rapide. Des plantules âgées de 6 semaines ont été transférées en sol. Les plantules du mutant aba2 ont été incapables de croître dans des conditions de serre standards et ont été mises à pousser sous un film de plastique dans la serre (avec une atmosphère saturée en eau) ou dans une chambre de croissance (90 % d'humidité relative, 16 h de jour/8 h de nuit et de 25°/17°C). Toutes les analyses moléculaires et biochimiques ont été réalisées sur des feuilles non-stressées récoltées avant la période de floraison. Le protocole de stress hydrique utilisé a été décrit par Parry et al., (1991).

### 1.2. Résultats

La transposition de Ac a été contrôlée dans la descendance (R<sub>1</sub>) des transformants primaires en utilisant le marqueur d'excision de la résistance à la kanamycine. Ceci a permis la sélection de 1000 plantes R<sub>1</sub> résistantes à la kanamycine qui ont été cultivées jusqu'à maturité, et dont la descendance a été mise à germer in vitro.

L'une d'entre elles (AA67) a montré une ségrégation pour un phénotype de germination précoce. Des graines du mutant AA67 fraîchement récoltées ont germé en 4 à 7 jours, alors que les graines de type sauvage ont nécessité 10 à 15 jours. Ce phénotype présentait une ségrégation de type mendélien caractéristique d'une mutation récessive et monogénique. Les jeunes plantules mutantes étaient extrêmement sensibles au stress hydrique probablement parce qu'elles n'assuraient pas la fermeture de leurs stomates. Les feuilles mutantes ont perdu 48% de leur poids frais (FW) en 60 min dans un courant d'air alors que pendant la même période, les feuilles de type sauvage ont perdu seulement 11% de FW (figure 1). Ceci a imposé de mettre les plantes à pousser dans 90 à 100 % d'humidité relative. Les jeunes plantes mutantes traitées par une pulvérisation journalière d'ABA à 40  $\mu$ M pendant deux semaines ont récupéré la vitesse de transpiration du type sauvage lorsque des feuilles détachées ont été testées (données non-présentées). Le greffage de plantes mutantes sur des tiges de tabac de type sauvage a également permis la restauration du phénotype sauvage.

Le mutant AA67 a été croisé avec le mutant aba1, précédemment isolé chez N. plumbaginifolia (Bitoun et al, 1989, Rousselin et al., 1992). La complémentation entre ces deux mutants a montré qu'ils étaient mutés sur des gènes différents. En conséquence, le mutant AA67 a été appelé aba2.

## 2. Relation entre la mutation aba2 et l'insertion de l'élément Ac

### 2.1. Matériel et méthode

#### 2.1.1. Analyse de Southern

L'ADN génomique a été extrait à partir de 2 g de matériel foliaire comme décrit par Dellaporta et al. (1983), et purifié sur un gradient de chlorure de césium. Dix  $\mu$ g d'ADN ont été digérés par les enzymes de restriction appropriées, séparés sur des gels d'agarose à 0,8 % et transférés sur une membrane de nylon (Hybond-N, Amersham).



L'hybridation des membranes a été réalisée dans des conditions stringentes en utilisant les sondes A (un fragment AccI-HindIII de 0,7 kb de l'extrémité 5' d'Ac), B (un fragment HindIII-AccI de 0,8 kb du bord 3' d'Ac) et C (une sonde d'IPCR décrite ci-dessous), comme représenté sur la figure 5.

### 2.1.2. Analyse de northern

Les ARN totaux des feuilles ont été extraits selon Verwoerd et al. (1989) et 8µg ont été chargés sur un gel d'agarose à 1,2 % contenant du formaldéhyde (Maniatis et al., 1982). Les hybridations ont été réalisées dans des conditions stringentes un utilisant la sonde C (figure 5) et le fragment d'ADNc EcoRI-Sall de 1,6 kb de la sous-unité β, codée par le noyau, de l'ATPase mitochondriale provenant de N. plumbaginifolia (Boutry et Chua, 1985).

### 2.1.3. Réaction inverse de polymérisation en chaîne (IPCR)

L'amplification IPCR des séquences adjacentes à Ac a été réalisée comme décrit par Earp et al. (1990). Pour l'amplification des séquences adjacentes 5' et 3', l'ADN génomique a été digéré par KpnI et ligaturé à l'aide de l'ADN ligase du phage T4. La réaction PCR a été réalisée avec les oligonucléotides #2 (5'-CGATAACGGTCGGTACGGGA-3') et #6 (5'-CCCGTTTCGTTTTCGTTACCG3'). L'oligonucléotide #2 s'hybride à 44 pb situées en aval du bord 5' d'Ac. L'oligonucléotide #6 s'hybride à 115 pb situées en amont du bord 3' d'Ac. Les réactions de PCR ont utilisé les conditions suivantes : 30 cycles de dénaturation de 45 sec à 94°C, 30 sec d'hybridation à 60°C, 2 min d'extension à 72°C avec une extension finale unique de 10 min à 72°C. Le fragment de 2 kb amplifié a été cloné et partiellement séquencé par des processus classiques. Ce fragment a été utilisé comme sonde C (figure 5) pour s'hybrider à des transferts northern et Southern et pour cribler une banque d'ADNc.

## 2.2. Résultats

### 2.2.1. La mutation aba 2 est due à l'insertion de Ac.

La mutation responsable de la déficience en ABA a co-ségrégué avec une nouvelle bande s'hybridant à Ac dans l'analyse de Southern de la descendance par autofécondation d'une plante R<sub>1</sub> AA67. Les ADN provenant de la descendance mutante et sauvage ont été analysés par digestion par différentes enzymes et hybridés avec la sonde A (bord 5' de Ac). Après digestion EcoRI, le transformant primaire (R<sub>0</sub>) a présenté une bande unique de 3 kb s'hybridant à Ac, correspondant à la localisation d'Ac au sein de l'ADN-T (figure 4). Dans la plante R<sub>1</sub> AA67, deux nouvelles insertions d'Ac (signaux d'hybridation à 4,5 et à 2,6 kb) ont été révélées par la même sonde. Comme visualisé sur la figure 4, la bande de 4,5 kb était présente dans chaque plante mutante R<sub>2</sub> (M1 à M3) mais seulement dans certaines des plantes soeurs R<sub>2</sub> présentant un phénotype sauvage (N1 à N5). La bande plus petite de 2,6 kb représentait une seconde insertion d'Ac, non-liée à la mutation responsable de la déficience en ABA.

En tout, 26 plantes présentant un phénotype sauvage et 13 plantes mutantes ont été analysées. Toutes les plantes mutantes ont présenté la bande de 4,5 kb s'hybridant à Ac. Sur 26 plantes normales, 17 avaient la bande de 4,5 kb et présentaient une ségrégation, au niveau de leur descendance, dans laquelle une plante sur quatre avait le phénotype mutant. 8 autres plantes ne présentaient pas la bande de 4,5 kb et ont donné une descendance de type sauvage. Ces résultats sont en accord avec le rapport des hétérozygotes pour la mutation (deux-tiers) (66,6%) attendu au sein de plantes ayant un phénotype de type sauvage. Ces données ont suggéré que la mutation était liée à la bande trAc.

Une des plantes à phénotype sauvage ne présentait pas la bande à 4.5 kb mais ségrégeait le phénotype mutant en descendance. La possibilité d'une excision d'Ac dans cette plante a été étudiée.

### 2.2.2. La mutation aba2 est instable.

Le mutant hétérozygote ne présentant pas la bande de 4.5 kb pourrait être dû à un événement d'excision imprécise ne restaurant pas la  
5 fonctionnalité du gène. Un fragment Kpn I (figure 5) a été cloné et séquencé après amplification IPCR. Des oligonucléotides ont été synthétisés de chaque côté de l'insertion d'Ac. L'ADN correspondant a été amplifié et séquencé chez le sauvage et le mutant hétérozygote. Une  
10 empreinte d'excision de 7pb laissée par l'excision d'Ac est vraisemblablement responsable du phénotype. En effet, la séquence partielle du fragment Knp I indique que l'insertion d'Ac s'est produite dans une séquence codante. L'excision d'Ac a provoqué l'introduction d'un codon stop TGA en phase dans les 7pb additionnelles et le mutant stable a été appelé aba 2-s1.

15 La descendance provenant d'une plante mutante, homozygote pour la bande de 4,5 kb s'hybridant à Ac, a été mise à pousser et criblée pour l'apparition d'événements de réversions somatique et germinale, aboutissant à une vitesse de transpiration normale et à une survie dans des  
20 conditions de serre. La réversion de la mutation vers le type sauvage devrait être en corrélation avec la restauration d'un fragment d'ADN de la taille de celui du type sauvage. Cinq plantes révertantes (trouvées parmi approximativement 5000 graines) ont été analysées au niveau moléculaire (figure 7). Lorsqu'elles sont hybridées avec la sonde C, les transferts de  
25 Southern des plantes mutantes ont présenté un fragment EcoRV de 10 kb, s'hybridant également aux sondes d'Ac. Une bande EcoRV de 2,8 kb a été également révélée et correspond à un fragment génomique situé en aval du point d'insertion d'Ac (figure 5). Les plantes de type sauvage ont présenté une bande de 5,5 kb et la bande de 2,8 kb. Les révertants  
30 portaient le fragment EcoRV de 10 kb avec des quantités variables du fragment de 5,5 kb trouvé dans le type sauvage. Des niveaux variables de signaux suggèrent que les révertants sont des chimères, dans lesquelles seulement une partie des cellules a récupéré la potentialité à synthétiser l'ABA, complétant ainsi les secteurs mutés et conférant un phénotype  
35 de type sauvage. Le profil à deux bandes trouvé dans les plantes

révertantes était similaire à celui observé avec l'ADN provenant de plantes hétérozygotes  $R_2$  (ligne  $R_2$  sur la figure 7), alors que dans des plantes mutantes homozygotes, seule la bande s'hybridant à Ac était visible, ainsi que la bande de 2,8 kb, située en aval de l'insertion d'Ac (pistes M4 et M5 sur la figure 7). La descendance de certaines plantes révertantes a été semée et évaluée vis-à-vis d'un phénotype à germination précoce. Les révertants 1, 2 et 3 ont présenté une ségrégation de la descendance avec un taux de un quart de germination précoce, ainsi ils ont été considérés comme des événements d'excision d'Ac affectant les cellules L2 engendrant une descendance révertante. Le révertant 4 a donné une descendance homogène à germination précoce et il pourrait être considéré comme un révertant somatique. Pour deux de ces révertants, l'excision d'Ac a restauré exactement le profil du type sauvage (voir figure 8).

### 2.2.3. L'insertion d'Ac est dans une séquence codante.

L'analyse de transfert northern réalisée sur l'ARN total de feuilles de type sauvage et mutantes permet d'observer un transcrit unique de 2,5 kb dans les feuilles de type sauvage après hybridation avec la sonde C (figure 5), alors que chez les feuilles mutantes l'ARNm était long de 7,1 kb. Cette différence de 4,6 kb a suggéré la présence d'un élément Ac entier dans une séquence codante (figure 6). Ceci a été confirmé par le séquençage partiel du fragment d'IPCR (voir plus loin). Un témoin d'hybridation a été réalisé avec la sous-unité  $\beta$ , codée par le noyau, de l'ATPase mitochondriale de N. plumbaginifolia (Boutry et Chua, 1985).

### 3. Déficience du mutant aba2 pour l'époxidation de la zéaxanthine.

Comme l'instabilité de la mutation aba2 pouvait donner naissance à des secteurs de réversion, les mesures d'ABA et de caroténoïdes ont été effectuées sur les feuilles du mutant aba2-s1.

### 3.1. Matériel et méthode

#### 3.1.1. Analyse de l'ABA

5 L'analyse de l'ABA et de ses métabolites a été réalisée comme décrit par Julliard et al., (1993). Des échantillons de feuilles ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide et lyophilisés avant d'être réduits en poudre. Une extraction dans du méthanol non-oxydatif/eau (80:20, v/v), une pré-purification et un fractionnement par  
10 chromatographie liquide haute-pression (HPLC) utilisant un gradient d'acide formique/méthanol 0,2 % (v/v) ont été réalisés comme décrit ci-dessus. Une quantification des molécules immunoréactives a été réalisée en utilisant un test d'immunosorbant lié à l'enzyme (ELISA). Ce test ELISA a été légèrement modifié, en utilisant un anticorps monoclonal anti-ABA  
15 disponible auprès de Phytoscience (Angers, France), marqué par la peroxydase conjuguée à un anticorps de chèvre dirigé contre des immunoglobulines de souris (Sigma).

#### 3.1.2. Analyse des caroténoïdes

20 Pour les mesures des chlorophylles et des caroténoïdes, des feuilles ont été congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C. Des échantillons de feuilles (100 mg de poids frais), ont été broyés dans un mortier avec de l'azote liquide et environ 5 mg de  $\text{NaHCO}_3$  et ensuite, ont été extraits par un  
25 solvant contenant un mélange d'acétone-méthanol-éther de pétrole (50-30-20 %). Les extraits ont été centrifugés pendant 5 min à 12 000 g et le surnageant stocké dans de la glace. Le culot a été remis en suspension dans le solvant ci-dessus et centrifugé de nouveau. Ce processus a été répété jusqu'à ce que le surnageant soit incolore. Les surnageants finaux ont été  
30 passés à travers des filtres de 0,5  $\mu\text{m}$  et ensuite évaporés. Les extraits secs ont été stockés à -20°C à l'obscurité sous argon. Les pigments de type caroténoïde ont été séparés par une HPLC non-aqueuse en phase inverse comme décrit par Gilmore et Yamamoto (1991).

### 3.2. Résultats

#### 3.2.1. La teneur en ABA est réduite chez le mutant aba2-s1.

5        Trois mesures indépendantes (chacune répétée cinq fois) de la  
teneur en ABA ont été effectuées sur des feuilles non stressées de 3 à 5  
plantes. Les feuilles sauvages présentaient de  $393 \pm 57$  à  $1263 \pm 36$  pmol  
d'ABA par gramme de poids sec, et de  $158 \pm 11$  à  $236 \pm 21$  pmol (équivalent  
10 aba 2-s1 était comprise entre 23 et 48 % du sauvage, tandis que celle en  
AGA-GE était indétectable dans deux des expériences et de 139 pmol dans la  
troisième.

#### 15 3.2.2. La composition en caroténoïdes est modifiée chez le mutant aba2-s1.

La possibilité que la lésion dans le mutant aba2 affecte la partie C<sub>40</sub>  
de la voie de biosynthèse de l'ABA a été étudiée en analysant le contenu en  
caroténoïdes des deux types de feuilles sauvages et mutantes. Une des trois  
20 mesures indépendantes réalisées est représentée sur la figure 2. Il n'y a  
aucune différence significative dans la quantité totale de caroténoïdes  
accumulés dans les deux génotypes (respectivement  $3065 \pm 160$  et  $3704 \pm$   
 $900$  µg de caroténoïdes totaux par g de FW). Il y avait des différences  
significatives concernant la zéaxanthine et les produits dérivés. La  
25 zéaxanthine apocaroténoïde n'a pas pu être détectée dans les feuilles de  
type sauvage, mais elle s'est accumulée jusqu'à 7% du contenu total en  
pigments dans les feuilles du mutant. Au contraire, la violaxanthine,  
l'anthéaxanthine et la néoxanthine n'ont pu être détectées dans les  
feuilles du mutant, comparées aux feuilles de type sauvage, où la quantité  
30 totale des trois molécules a représenté 4,1% du contenu total en  
caroténoïdes. Il peut être noté que les niveaux de β-carotène, de lutéine et  
de chlorophylles ont été comparables dans le type sauvage et chez le  
mutant, suggérant que la photo-protection des appareils  
photosynthétiques n'est pas affectée par la mutation. Selon les mesures des

caroténoïdes, on peut conclure que le mutant aba2-s1 présente une déficience au niveau de l'époxydation de la zéaxanthine qui est de manière conséquente accumulée et aboutit à l'absence des produits suivants dans la biosynthèse de l'ABA (figure 3).

5

#### 4. Clonage d 'ADNc et séquence nucléotidique

##### 4.1. Matériel et méthode

10

#### Construction et criblage d'une banque d'ADNc.

De jeunes plantes, au premier stade foliaire, (âgées de 3 à 4 semaines) ont été récoltées (en incluant les racines) et l'ARN total a été purifié. La fraction poly (A)+ a été sélectionnée sur des colonnes oligo dT (Pharmacia). L'ADNc double-brin a été synthétisé en utilisant un kit de  
15 synthèse d'ADNc (Promega) et un adaptateur-amorce-NotI-oligo (dT). Après la ligation d'adaptateurs EcoRI (Pharmacia), l'ADNc a été digéré par NotI et cloné de manière directionnelle dans le vecteur  $\lambda$ gtII Sfi-Not (Promega). Environ  $1,5 \times 10^6$  recombinants indépendants ont été obtenus  
20 après empaquetage phagique (Stratagene) et infection dans la souche LE 392 (Promega). La banque d'ADNc de  $\lambda$ gtII a été amplifiée dans la souche RY 1090 d'Escherichia coli. Une hybridation de plaques phagiques, en utilisant la sonde C, a été réalisée selon des procédures standards (Maniatis et al., 1982). Des lavages ont été faits dans des conditions de faible  
25 stringence dans SCC 2 x, sarkosyl 0,5 % à 65°C. Les inserts d'ADN des phages recombinants positifs ont été clonés de manière subséquente dans les sites EcoRI-NotI d'un vecteur pBS-SK+ (Stratagene) et dans les sites EcoRI-SacI d'un vecteur pGEM-7Z (Promega). En utilisant ces sous-clones, le séquençage des deux brins a été réalisé après digestion partielle à l'aide  
30 d'un kit de délétion à une Exonuclease III (Pharmacia). La séquence nucléotidique des clones délétés a été déterminée avec un dispositif de séquençage d'ADN automatique ABI 373A (Applied Biosystems) en utilisant des amorces à coloration et une enzyme Sequenase.

35

#### 4.2. Résultats

La sonde C radioactive a été utilisée pour cribler  $3 \times 10^5$  plaques de la banque  $\lambda$ gt11. Un clone positif a montré un insert de 2,4 kb. Ceci était la  
5 taille attendue pour le transcrit (figure 6). Après le clonage dans un vecteur pBluescript, et un sous-clonage dans un vecteur pGEM, l'insert a été complètement séquencé sur les deux brins. La séquence complète de l'ADNc (longue de 2400 nucléotides) et le plus grand cadre de lecture ouvert (ORF) démarrant par une méthionine sont représentés sur la  
10 figure 8. Cet ORF se compose de 1989 pb, correspondant à un polypeptide de 663 résidus d'acides aminés (aa), ayant une masse moléculaire prédite de 72,54 kDa. Un codon stop en phase situé en amont de cet ORF au niveau de la position nucléotidique -20 confirme que l'ORF présenté sur la figure 6A est la région codante entière du gène correspondant. Si l'ATG au niveau du  
15 nucléotide 1 est le codon d'initiation, l'ADNc a une séquence 5' non-traduite de 40 pb, une région codante de 1989 pb, et une séquence 3' non-traduite de 310 pb, suivie par une queue poly(A) (longue de 58 pb). La séquence 3' non-traduite contient trois signaux supposés d'addition de poly(A) (ATAAA) au niveau des nucléotides 2015, 2109 et 2276 (Joshi, 1987).

20

Comme indiqué par un séquençage partiel du fragment KpnI d'IPCR cloné, l'insertion d'Ac a lieu dans l'ORF au niveau du nucléotide 434 (aa 145). Les 8 pb dupliquées après l'insertion d'Ac dans l'ADN génomique sont encadrées sur la figure 8.

25

#### 4.3. Recherche d'homologie de séquence.

Les séquences des nucléotides et des acides aminés ont été utilisées pour vérifier les homologies possibles avec des séquences dans des  
30 banques de données. Les recherches dans les banques de données (National Center for Biotechnology Information utilisant the BLAST network service) ont révélé trois segments de la séquence d'acides aminés ayant une homologie significative avec des protéines connues de Pseudomonas sp. ou d'E. coli (figure 9). Les meilleurs ajustements ont été



obtenus avec nahG (salicylate 1-hydroxylase, You et al., 1991); ubiH (2-octaprényl-6-méthoxyphénol monooxygénase, Nakahigashi et al., 1992), visA (ferrochélatase, Nakahigashi et al., 1992), pheA (phénol monooxygénase, Nurk et al., 1991); pcpB  
5 (pentachlorophénol-4-monooxygénase, Orser et al., 1993) et PHBH (p-hydroxybenzoate hydroxylase, Weijer et al., 1982). Toutes ces séquences protéiques partagent une fonction commune, qui est une hydroxylation ou une oxydation d'un cycle aromatique. Ceci est en accord avec l'activité supposée de la protéine codée par l'ADNc cloné, c'est-à-dire l'époxydation  
10 de la zéaxanthine, un substrat contenant un cycle aromatique. Deuxièmement, ces enzymes utilisent un cofacteur commun, soit le FAD soit le NAD(P). Ainsi, un site de liaison à l'ADP est localisé au niveau des acides aminés 81 à 109, qui correspondent à la séquence consensus (empreinte) impliquée dans la liaison à l'ADP (Wierrenga et al., 1986). Ce  
15 motif riche en glycines, commun aux enzymes se liant au cofacteur, permet de prédire si une séquence d'acides aminés particulière peut se replier en  $\beta\alpha\beta$  avec des propriétés de liaison à la partie ADP de la NAD(P) ou du FAD. Ainsi, un site supposé de liaison au FAD a été trouvé. La séquence d'acides aminés MQHGRLFLAGD est impliquée dans la liaison au  
20 FAD de PHBH (Wijnands et al., 1986). Les résidus d'acides aminés 359 à 372 montrent 9 résidus identiques avec cette séquence, suffisamment pour garantir la conformation qui est nécessaire à la liaison au FAD. Quelques résidus au-delà de ce segment, les acides aminés 379 et 382 de notre époxydase supposée sont présents dans les séquences de PHBH et de la  
25 salicylate-1-hydroxylase et ont été décrits comme ayant une importance structurale et fonctionnelle dans ces enzymes (You et al., 1991). Un troisième fragment d'homologie est compris entre les résidus d'acides aminés 230 et 249 de l'ORF. Ce segment d'homologie n'a pas encore été décrit jusqu'à maintenant, mais est présent dans toutes les séquences  
30 protéiques présentant une certaine homologie avec la séquence en question.

## 5. La protéine ABA2 est importée dans les chloroplastes

Les recherches sur les bases de données ont indiqué l'existence d'une extension à l'extrémité amino terminale de l'ADNc par rapport aux protéines de Pseudomonas et d'E. coli. L'extension à l'extrémité amino terminale était comprise entre les résidus d'acides aminés 1 et 50. Le contenu en acides aminés dans cette région de la séquence a révélé un enrichissement en sérine et en thréonine. Ces acides aminés constituent respectivement 18 et 8% du contenu total en acides aminés de ce peptide, alors qu'ils sont beaucoup moins abondants dans la séquence complète de 663 acides aminés (6,8 et 5% respectivement). Cette caractéristique a été décrite dans des peptides connus d'adressage au chloroplaste, responsables de l'import de protéines nucléaires (Von Heijne et al., 1989).

### 5.1. Matériel et méthode.

L'ADNc cloné dans un vecteur pBS-SK+ était traduit à partir du promoteur de l'ARN polymérase de T3. La construction Psad, codant pour une protéine du photosystème I localisée dans les chloroplastes (Kjaruff et Okkels, 1993), a été utilisée comme témoin positif pour les réactions d'import. La transcription/traduction in vitro a été réalisée avec 1 µg de chaque plasmide et avec de la méthionine marquée au S35 en utilisant le Système de Lysats de Réticulocytes couplés au TNT (Promega Corporation, Madison, WI). Des chloroplastes ont été isolés à partir de feuilles provenant de plantes de pois âgées de deux semaines selon Cline et al. (1985). Les tests d'import ont été réalisés comme décrit par Hoff et al. (1995). Les échantillons ont été analysés sur des gels de polyacrylamide-SDS (12 % pour la réaction d'import de Psad et 5% pour notre construction) selon Laemmli (1970), suivis par une fluorographie (Skinner et Griswold, 1983).

### 5.2. Résultats

Afin d'étudier la localisation chloroplastique de la zéaxanthine époxydase, on a réalisé la transcription et traduction in vitro du clone

d'ADNc correspondant. Les produits de traduction marqués ont été incubés avec des chloroplastes purifiés de pois. Une partie aliquote de la réaction a été traitée avec de la thermolysine pour dégrader les protéines situées à la surface du chloroplaste, ainsi seules les protéines situées à l'intérieur des organites étaient protégées. La Figure 10 représente la fluorographie du gel de polyacrylamide-SDS chargé avec les réactions d'import. PsaD, une protéine de 28 kDa du photosystème I, utilisée comme témoin positif, a été importée et maturée (20kDa) comme attendu (données non présentées). La protéine époxydase (72,5 kDa) a été également importée et maturée en une protéine mature de 69 kDa, en accord avec l'analyse des données de séquences.

## 6. L'ADNc cloné complémente la mutation aba2-s1.

### 6.1. Matériel et méthode.

Le vecteur de transformation végétale pKYLX71-35S<sup>2</sup> a été utilisé pour cloner l'ADNc entre un promoteur 35S ayant un domaine activateur dupliqué B et une région rbcS 3' (Maiti et al. 1993). Le plasmide résultant, ainsi qu'un plasmide témoin sans l'insert d'ADNc, ont été introduits par conjugaison triparentale dans une souche LBA4404 d'Agrobacterium tumefaciens désarmée, comme décrit par Koncz et Schell (1986). La transformation de disques de feuilles a été réalisée comme décrit précédemment (Marion-Poll et al., 1993). Des feuilles de mutants homozygotes aba2-s1 de plantes cultivées in vitro ont été utilisées.

### 6.2. Résultats

Des disques de feuilles de plantes aba2-s1 ont été transformés via Agrobacterium par une construction comportant l'ADNc de l'époxydase sous contrôle du promoteur 35S ou par un plasmide témoin sans insert. Les transformants régénérés poussant sur un milieu sélectif ont été testés pour leur composition en caroténoïdes. Les régénérants transformés par un plasmide témoin ont montré une absence d'anthéroxanthine, de néoxanthine et de violaxanthine, et une accumulation de zéaxanthine

comme le témoin non-transformé. Les régénérants obtenus après transformation par la construction contenant l'ADNc ont présenté une composition en caroténoïdes de type sauvage. Ainsi l'ADNc cloné a été capable de rétablir le phénotype sauvage lorsqu'il est réintroduit dans  
5 l'environnement génétique mutant, fournissant un argument supplémentaire pour l'étiquetage du gène de l'époxydase.

## 7. Cartographie du locus ABA2 dans Arabidopsis.

### 10 7.1. Matériel et méthode.

#### Cartographie de l'EST d'Arabidopsis.

Le criblage par PCR de la banque YAC CIC a été effectué sur des lots  
--15 de YACS tridimensionnels. Les oligonucléotides utilisés permettaient l'amplification d'un fragment de 230 pb de la séquence EST (T45502).

### 7.2. Résultats.

20 La comparaison de la séquence d'ADNc avec des séquences EST (Expressed Sequence Tags) d'une base de données (dbEST) a abouti à l'identification d'une EST homologue chez Arabidopsis thaliana (numéro de référence T45502). Cette séquence EST est longue de 480 pb et la  
25 séquence d'acides aminés déduite entre la paire de bases 4 et la paire de bases 210 montre 71 % d'identité (81 % de similarité) avec la séquence d'acides aminés de l'ADNc de N. plumbaginifolia. Des oligonucléotides, permettant d'amplifier un fragment de 230 pb dans l'ADNc de A. thaliana et un fragment génomique de 416 pb, ont été utilisés pour cribler la  
banque YAC CIC d'Arabidopsis (Creusot et al., en préparation). Un clone  
30 YAC unique a été identifié qui est situé en bas du chromosome cinq et fait partie d'un contig contenant le marqueur RFLP ve028, situé à la position 134.1 sur la carte (Lister, 1995). Cette localisation est en parfaite corrélation avec la position du locus aba sur la carte d'Arabidopsis (Koornneef et al., 1982). Ce résultat, sans être une preuve définitive,  
35 fournit un argument supplémentaire pour dire que le locus ABA2 de N. plumbaginifolia est l'homologue du locus ABA d'Arabidopsis.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Baker, B., Coupland, G., Fedoroff, N., Starlinger, P. and Schell, J. (1987) Phenotypic assay for excision of the maize controlling element Ac in Tobacco. EMBO J. 6, 1547-1554.  
5
2. Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors. Nuc. Acid Res., 12, 8711-8721.
- 10 3. Bitoun, R., Rousselin, P. and Caboche, M. (1989) A pleiotropic mutation results in cross-resistance to auxin, abscisic acid and placobutrazol. Mol. Gen. Genet., 220, 234-239.
- 15 4. Boutry, M. and Chua, N.H. (1985) A nuclear gene encoding the beta subunit of the mitochondrial ATP synthase in *Nicotiana plumbaginifolia*. EMBO J. 4, 2159-2165.
- 20 5. Chilton, M.D., Tepfer, D.A., Petit A., David, C., Casse-Delbart, F., and Tempé, J. (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells. Nature, 295, 432-434.
6. Dellaporta, S.L., Woods, J. and Hicks, J.B. (1983) A plant DNA miniprepation version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1, 19-21.
- 25 7. Duckham, S.C., Taylor, I.B., Lindforth, R.S.T., Al-Naieb, R.J., Marples, B.A. and Bowman, W.R. (1989) The metabolism of cis ABA-aldehyde by the wilted mutants of potato, pea and Arabidopsis thaliana. J. Exp. Bot. 40, 901-905.
- 30 8. Duckham, S.C., Lindforth, R.S.T., Taylor, I.B. (1991) Absciscic acid-deficient mutants at the aba gene locus of Arabidopsis thaliana are impaired in the epoxidation of zeaxanthin. Plant Cell Environ. 14, 601-606.
- 35 9. Earp, D.J., Lowe, B. and Baker, B (1990) Amplification of genomic sequences flanking transposable elements in host and heterologous plants : a tool for transposon tagging and genome characterization. Nucl. Acids Res. 18, 3271-3279.

10. Gabard, J., Marion-Poll, A., Chérel, I., Meyer, C., Müller, A. and Caboche, M. (1987) Isolation and characterization of Nicotiana plumbaginifolia nitrate reductase-deficient mutants : genetic and biochemical analysis of the NIA complementation group. Mol. Gen. Genet. 209, 596-606.
- 5
11. Gage, D.A., Fong, F. and Zeevaart, J.A.D. (1989) Absciscic acid biosynthesis in isolated embryos of Zea mays L. Plant Physiol. 89, 1039-1041.
- 10
12. Gilmore, A.M. and Yamamoto, H.Y. (1991) Resolution of lutein and zeaxanthin using a non-endcapped, lightly carbon-loaded C18 high performance liquid chromatographic column. Journal of chromatography 543, 137-145.
- 15
13. Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F. and Goodman, H.M. (1992) Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. Plant Cell, 4, 1251-1261.
- 20
14. Hoff, T., Schnorr, K., Meyer, C. and Caboche, M. (1995) Isolation of two *Arabidopsis* cDNAs involved in early steps of molybdenum cofactor biosynthesis by functional complementation of *Escherichia coli* mutants. J. Biol. Chem., 270, 6100-6107.
- 25
15. Horsch, R.B. and Klee, H.J. (1986) Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by *Agrobacterium tumefaciens* : role of T-DNA borders in the transfer process. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4428-4432.
- 30
16. Joshi, C.P. (1987) Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants : a compilation and analysis. Nucleic Acids Res. 15, 9627-9640.
- 35
17. Julliard, J., Pelese, F., Sotta, B., Maldiney, R., Primard-Brisset, C., Jouanin, L., Pelletier, G. and Miginiac, E. (1993) TI-DNA transformation decreases ABA levels. Physiol. Plant. 88, 654-660.

18. Kermode, A.R. (1990) Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9, 155-195.
- 5 19. Koncz, C. and Schell, J. (1986) The promoter of the TL-DNA gene 5 controls the tissu-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396.
- 10 20. Koornneef, M., Jorna, M.L., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C. and Karssen, C.M. (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin-sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* (L) *Heinh. Theor. Appl. Genet.* 61, 385-393.
- 15 21. Koornneef, M., Reuiling, G. and Karssen, C.M. (1984) The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 61, 377-383.
- 20 22. Koornneef, M., Hanhart, C.J., Hilhorst, H.W.M. and Karssen, C.M. (1989) In vitro inhibition of seed development and reserve protein accumulation in recombinants of abscisic acid biosynthesis and responsiveness mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 90, 463-469.
- 25 23. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- 30 24. Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P-C., Guerrier, D., Cheddor, F. and Giraudat, J. (1994) *Arabidopsis* ABA response gene ABA1 : Features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science*, 264, 1448-1452.
- 35 25. Li, Y. and Walton, D.C. (1990) Violaxanthin is an abscisic acid precursor in water-stressed dark-grown bean leaves. *Plant Physiol.* 92, 551-559.
26. Linforth, R.S.T., Bowman, W.R., Griffin, D.A., Marples, B.A. and Taylor, I.B. (1987) 2-trans-ABA alcohol accumulation in the wilted tomato mutants flacca and sitiens. *Plant Cell Environ.* 10, 599-606.

27. Lister C. (1995), Latest Lister and Dean Ri map. Weeds World Vol. 2.
28. Maiti, I.B., Murphy, J.F., Shaw, J.G. and Hunt, A.G. (1993) Plants that express a potyvirus VPg-proteinase gene are resistant to virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 6110-6114.
29. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
30. Marion-Poll, A., Marin, E., Bonnefoy, N., and Pautot, V. (1993) Transposition of the maize autonomous element Ac in transgenic Nicotiana plumbaginifolia plants. Mol. Gen. Genet. 238, 209-217.
31. McCarty, D.R., Cardon, C.B., Stinard, P.S. and Robertson, D.S. (1989) Molecular analysis of viviparous-1 : an abscisic acid-insensitive mutant of maize. Plant Cell, 1, 523-532.
32. Meyer, K., Leube, M.P. and Grill E. (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana. Science, 264, 1452-1455.
33. Moore, R. and Smith, J.D. (1985) Graviresponsiveness and abscisic-acid content of roots of carotenoid-deficient mutants of Zea-mays L. Planta, 164, 126-128.
34. Nakahigashi, K., Miyamoto, K., Nishimura, K. and Inokuchi, H. (1992) Isolation and characterization of a light-sensitive mutant of Escherichia coli K-12 with a mutation in a gene that is required for the biosynthesis of ubiquinone. J. Bacteriol. 174, 7352-7359.
35. Neil, S.J., Horgan, R. and Parry, A.D. (1986) The carotenoid and abscisic acid content of viviparous kernels and seedlings of Zea mays L. Planta, 169, 87-96.



36. Nurk, A., Kasak, L. and Kivisaar, M. (1991) Sequence of the gene (pheA) encoding phenol monooxygenase from Pseudomonas sp. EST1001 : expression in Escherichia coli and Pseudomonas putida. Gene, 102, 13-18.
- 5 37. Orser, C.S., Lange, C.C., Xun, L., Zahrt, T.C. and Schneider, B.J. (1993) Cloning, sequence analysis, and expression of the Flavobacterium pentachlorophenol-4-monooxygenase gene in Escherichia coli. J. Bacteriol. 175, 411-416.
- 10 38. Parry, A.D., Babiano, M.J. and Horgan, R. (1990) The role of cis-carotenoids in abscisic acid biosynthesis. Planta, 182, 118-128.
39. Parry, A.D., Blonstein, A.D., Babiano, M.J., King, P.J. and Horgan, R. (1991) Absciscic-acid metabolism in a wilted mutant of Nicotiana  
15 plumbaginifolia. Planta, 183, 237-243.
40. Robichaud, C.S., Wong, J. and Sussex, I.M. (1980) Control of in vitro growth of viviparous embryo mutants of maize by abscisic acid. Dev. Genet. 1, 325-330.
- 20 41. Rock, C.D. and Zeevaart, J.A.D. (1991) The aba mutant of Arabidopsis thaliana is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 7496-7499.
- 25 42. Rousselin, P., Kraepiel, Y., Maldiney, R., Miginiac, E. and Caboche, M. (1992) Characterization of three hormone mutants of Nicotiana plumbaginifolia : evidence for a common ABA deficiency. Theor. Appl. Genet., 85, 213-221.
- 30 43. Schell et Van Montagu (1983).
44. Skinner, M.K. and Griswold, M.D. (1983) Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with 2,5-diphenyloxazole in acetic acid and its comparison with existing procedures. Biochem. J. 209, 281-284.

45. Tal, M. and Nevo, Y. (1973) Abnormal stomatal behaviour and root resistance, and hormonal imbalance in three wilted mutants of tomato. *Biochem. Genet.* 8, 291-300.
- 5 46. Taylor, I.B. (1991) Genetics of ABA synthesis. In *Abscisic Acid/Physiology and Biochemistry*, W.J. Davies and H.G. Jones eds. (Oxford : Bios Scientific), pp. 23-25.
- 10 47. Taylor, I.B., Lindforth, R.S.T., Al-Naieb, R.J., Bowman, W.R. and Marples, B.A. (1988) The wilted tomato mutants flacca and sitiens are impaired in the oxidation of ABA-aldehyde to ABA. *Plant Cell Environ.*, 11, 739-745.
- 15 48. Verhoerd, T.C., Dekker, B.M.M. and Hoekema, A. (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucl. Acids Res.* 17, 2362.
- 20 49. Von Heijne, G., Steppuhn, J., and Herrmann, R.G. (1989) Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180, 535-545.
50. Wierenga, R.K., Terpstra, P. and Hol, W.G.J. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding  $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* 187, 101-107.
- 25 51. Weijer, W.J., Hofsteenge, J., Verreijken, J.M., Jekel, P.A. and Beintema, J.J. (1982) Primary structure of p-Hydroxybenzoate hydroxylase from Pseudomonas fluorescens. *Biochim. Biophys. Acta*, 704, 385-388.
- 30 52. Wijnands, R.A., Weijer, W.J., Muller, F., Jekel, P.A., van Berkel, W.J.H. and Beintema, J.J. (1986) Chemical modification of tyrosine residues in p-hydroxybenzoate hydroxylase from Pseudomonas fluorescens. assignment in sequence and catalytic involvement. *Biochemistry* 25, 4211-4215.

53. You, I-S., Ghosal, D. and Gunsalus, I.C. (1991) Nucleotide sequence analysis of the Pseudomonas putida PpG7 Salicylate hydroxylase gene (nahG) and its 3'-flanking region. Biochemistry 30, 1635-1641.
- 5 54. Zeevaart, J.A.D. and Creelman, R.A. (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 439-473.
- 10 55. Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J., 2, 2193-2250.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INRA
- (B) RUE: 147 RUE DE L'UNIVERSITE
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75338

(ii) TITRE DE L' INVENTION: CLONAGE DU GENE DE L'ACIDE ABSCISSIQUE

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 2400 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(iv) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA
- (B) SOUCHE: CV. viviani
- (D) STADE DE DEVELOPPEMENT: plantule
- (F) TYPE DE TISSU: plante entiere

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 41..2032

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TGAAGACTAC ACTCTTTCTT GAACTTGGGT TCAAGTAAAG ATG TAT TCA ACT GTG	55
Met Tyr Ser Thr Val	
1 5	
TTT TAC ACT TCA GTT CAT CCA TCC ACT TCA GCT TTT TCA AGA AAG CAG	103
Phe Tyr Thr Ser Val His Pro Ser Thr Ser Ala Phe Ser Arg Lys Gln	
10 15 20	
CTG CCT TTA TTG ATC TCT AAG GAT TTT CCA ACA GAG TTG TAT CAT TCT	151
Leu Pro Leu Leu Ile Ser Lys Asp Phe Pro Thr Glu Leu Tyr His Ser	
25 30 35	
TTA CCA TGC AGT AGA AGC TTG GAA AAT GGT CAA ATC AAG AAA GTC AAA	199
Leu Pro Cys Ser Arg Ser Leu Glu Asn Gly Gln Ile Lys Lys Val Lys	
40 45 50	
GGT GTA GTA AAA GCC ACA ATA GCT GAA GCT CCA GCA ACT ATT CCT CCA	247
Gly Val Val Lys Ala Thr Ile Ala Glu Ala Pro Ala Thr Ile Pro Pro	
55 60 65	

ACT	GAT	TTA	AAA	AAG	GTA	CCA	CAG	AAG	AAG	CTG	AAA	GTA	TTA	GTA	GCA	295
Thr	Asp	Leu	Lys	Lys	Val	Pro	Gln	Lys	Lys	Leu	Lys	Val	Leu	Val	Ala	
70					75					80					85	
GGT	GGT	GGG	ATT	GGA	GGA	TTA	GTT	TTT	GCA	TTG	GCG	GCA	AAG	AAA	AGG	343
Gly	Gly	Gly	Ile	Gly	Gly	Leu	Val	Phe	Ala	Leu	Ala	Ala	Lys	Lys	Arg	
			90						95						100	
GGA	TTT	GAT	GTG	TTG	GTA	TTT	GAG	AGA	GAT	TTA	AGT	GCT	ATT	AGA	GGA	391
Gly	Phe	Asp	Val	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Asp	Leu	Ser	Ala	Ile	Arg	Gly	
			105						110					115		
GAA	GGA	CAA	TAT	AGA	GGA	CCA	ATT	CAG	ATA	CAA	AGC	AAT	GCA	TTG	GCT	439
Glu	Gly	Gln	Tyr	Arg	Gly	Pro	Ile	Gln	Ile	Gln	Ser	Asn	Ala	Leu	Ala	
			120					125					130			
GCT	TTA	GAA	GCA	ATT	GAT	ATG	GAT	GTT	GCT	GAA	GAC	ATA	ATG	AAT	GCT	487
Ala	Leu	Glu	Ala	Ile	Asp	Met	Asp	Val	Ala	Glu	Asp	Ile	Met	Asn	Ala	
			135				140						145			
GGT	TGT	ATC	ACT	GGT	CAA	AGG	ATT	AAT	GGT	TTG	GTT	GAT	GGT	GTT	TCT	535
Gly	Cys	Ile	Thr	Gly	Gln	Arg	Ile	Asn	Gly	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Ser	
150					155					160					165	
GGT	AAC	TGG	TAT	TGC	AAG	TTT	GAT	ACG	TTT	ACT	CCA	GCC	GTG	GAA	CGC	583
Gly	Asn	Trp	Tyr	Cys	Lys	Phe	Asp	Thr	Phe	Thr	Pro	Ala	Val	Glu	Arg	
				170					175						180	
GGA	CTT	CCT	GTG	ACA	AGA	GTC	ATC	AGC	CGC	ATG	ACT	TTG	CAA	CAG	AAC	631
Gly	Leu	Pro	Val	Thr	Arg	Val	Ile	Ser	Arg	Met	Thr	Leu	Gln	Gln	Asn	
			185						190					195		
CTT	GCA	CGT	GCC	GTC	GGG	GAA	GAT	ATC	ATT	ATG	AAT	GAA	AGT	AAT	GTA	679
Leu	Ala	Arg	Ala	Val	Gly	Glu	Asp	Ile	Ile	Met	Asn	Glu	Ser	Asn	Val	
		200					205						210			
GTG	AAC	TTT	GAG	GAT	GAT	GGT	GAA	AAG	GTT	ACT	GTG	ACT	CTT	GAG	GAT	727
Val	Asn	Phe	Glu	Asp	Asp	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Val	Thr	Leu	Glu	Asp	
	215					220						225				
GGA	CAG	CAA	TAT	ACA	GGT	GAT	CTT	CTG	GTT	GGT	GCT	GAT	GGC	ATA	AGG	775
Gly	Gln	Gln	Tyr	Thr	Gly	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Ile	Arg	
230					235					240					245	
TCT	AAG	GTA	CGG	ACT	AAT	TTG	TTC	GGA	CCC	AGT	GAT	GTA	ACT	TAC	TCT	823
Ser	Lys	Val	Arg	Thr	Asn	Leu	Phe	Gly	Pro	Ser	Asp	Val	Thr	Tyr	Ser	
				250					255					260		
GGC	TAC	ACT	TGT	TAC	ACT	GGA	ATT	GCA	GAT	TTT	GTT	CCT	GCT	GAT	ATT	871
Gly	Tyr	Thr	Cys	Tyr	Thr	Gly	Ile	Ala	Asp	Phe	Val	Pro	Ala	Asp	Ile	
			265					270					275			
GAG	ACA	GTT	GGG	TAC	CGA	GTC	TTT	TTG	GGC	CAC	AAA	CAG	TAC	TTT	GTT	919
Glu	Thr	Val	Gly	Tyr	Arg	Val	Phe	Leu	Gly	His	Lys	Gln	Tyr	Phe	Val	
		280					285						290			
TCT	TCA	GAT	GTG	GGT	GGA	GGC	AAG	ATG	CAG	TGG	TAT	GCA	TTT	CAC	AAT	967
Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Gly	Lys	Met	Gln	Trp	Tyr	Ala	Phe	His	Asn	
		295				300						305				
GAA	CCA	GCT	GGC	GGT	GTG	GAT	GAT	CCA	AAC	GGT	AAA	AAG	GCA	AGA	TTG	1015
Glu	Pro	Ala	Gly	Gly	Val	Asp	Asp	Pro	Asn	Gly	Lys	Lys	Ala	Arg	Leu	
310					315					320					325	

CTT AAA ATA TTT GAG GGG TGG TGT GAC AAT GTT ATA GAC CTA TTA GTA Leu Lys Ile Phe Glu Gly Trp Cys Asp Asn Val Ile Asp Leu Leu Val 330 335 340	1063
GCC ACA GAT GAA GAT GCA ATT CTT CGA CGT GAC ATC TAT GAT AGA CCG Ala Thr Asp Glu Asp Ala Ile Leu Arg Arg Asp Ile Tyr Asp Arg Pro 345 350 355	1111
CCA ACA TTT AGT TGG GGA AAA GGT CGT GTT ACA TTG CTT GGG GAC TCT Pro Thr Phe Ser Trp Gly Lys Gly Arg Val Thr Leu Leu Gly Asp Ser 360 365 370	1159
GTC CAT GCT ATG CAG CCT AAT TTG GGT CAA GGG GGA TGC ATG GCC ATA Val His Ala Met Gln Pro Asn Leu Gly Gln Gly Gly Cys Met Ala Ile 375 380 385	1207
GAG GAT AGC TAT CAA CTA GCA CTG GAA CTT GAT AAA GCA TTG AGC CGA Glu Asp Ser Tyr Gln Leu Ala Leu Glu Leu Asp Lys Ala Leu Ser Arg 390 395 400 405	1255
AGC GCC GAG TCA GGA ACC CCT GTG GAT ATC ATC TCA TCT TTA AGG AGC Ser Ala Glu Ser Gly Thr Pro Val Asp Ile Ile Ser Ser Leu Arg Ser 410 415 420	1303
TAT GAA AGT TCT AGA AAA CTT CGA GTT GGA GTT ATC CAT GGA CTG GCT Tyr Glu Ser Ser Arg Lys Leu Arg Val Gly Val Ile His Gly Leu Ala 425 430 435	1351
AGA ATG GCT GCA ATC ATG GCA TCA ACT TAC AAG GCT TAT CTT GGT GTC Arg Met Ala Ala Ile Met Ala Ser Thr Tyr Lys Ala Tyr Leu Gly Val 440 445 450	1399
GGA CTT GGT CCA TTA TCA TTT TTG ACC AAG TTT AGG ATA CCA CAT CCT Gly Leu Gly Pro Leu Ser Phe Leu Thr Lys Phe Arg Ile Pro His Pro 455 460 465	1447
GGA AGA GTT GGT GGA AGA TTT TTT ATT GAC TTG GGA ATG CCG CTT ATG Gly Arg Val Gly Gly Arg Phe Phe Ile Asp Leu Gly Met Pro Leu Met 470 475 480 485	1495
TTA AGC TGG GTT CTA GGA GGC AAC GGG GAA AAG CTT GAA GGC AGA ATA Leu Ser Trp Val Leu Gly Gly Asn Gly Glu Lys Leu Glu Gly Arg Ile 490 495 500	1543
CAA CAT TGC AGG CTA TCT GAG AAA GCA AAT GAC CAA TTG AGA AAT TGG Gln His Cys Arg Leu Ser Glu Lys Ala Asn Asp Gln Leu Arg Asn Trp 505 510 515	1591
TTT GAA GAT GAT GAT GCT TTA GAG CGT GCT ACT GAT GCA GAG TGG CTA Phe Glu Asp Asp Asp Ala Leu Glu Arg Ala Thr Asp Ala Glu Trp Leu 520 525 530	1639
TTG CTT CCT GCC GGG AAT AGC AAT GCT GCT TTA GAA ACT CTC GTT TTA Leu Leu Pro Ala Gly Asn Ser Asn Ala Ala Leu Glu Thr Leu Val Leu 535 540 545	1687
AGC AGA GAT GAG AAC ATG CCT TGC AAT ATT GGG TCT GTC TCA CAT GCA Ser Arg Asp Glu Asn Met Pro Cys Asn Ile Gly Ser Val Ser His Ala 550 555 560 565	1735
AAC ATT CCT GGA AAA TCA GTT GTT ATA CCT TTG CCT CAG GTG TCC GAA Asn Ile Pro Gly Lys Ser Val Val Ile Pro Leu Pro Gln Val Ser Glu 570 575 580	1783

ATG CAC GCC CGG ATA TCC TAC AAA GGT GGA GCA TTT TTT GTA ACT GAT Met His Ala Arg Ile Ser Tyr Lys Gly Gly Ala Phe Phe Val Thr Asp 585 590 595	1831
TTA CGA AGT GAA CAT GGT ACC TGG ATT ACG GAT AAC GAA GGC AGA AGA Leu Arg Ser Glu His Gly Thr Trp Ile Thr Asp Asn Glu Gly Arg Arg 600 605 610	1879
TAC CGA GCA TCT CCA AAC TTC CCT ACT CGC TTT CAT CCA TCA GAT ATT Tyr Arg Ala Ser Pro Asn Phe Pro Thr Arg Phe His Pro Ser Asp Ile 615 620 625	1927
ATT GAA TTT GGT TCT GAT AAA AAG GCA GCA TTT CGC GTA AAG GTA ATG Ile Glu Phe Gly Ser Asp Lys Lys Ala Ala Phe Arg Val Lys Val Met 630 635 640 645	1975
AAA TTT CCT CCA AAA ACT GCT GCA AAA GAA GAG CGT CAA GCA GTG GGG Lys Phe Pro Pro Lys Thr Ala Ala Lys Glu Glu Arg Gln Ala Val Gly 650 655 660	2023
GCA GCT TGA AAATTCGGAA GTTTGGCCTG ATATAACGG GGAAATTGTA Ala Ala *	2072
CAGCATTTTT ATAGCAACAG CACAACTGA GCCATTAA TCAGCTAATT TTGTATACTG	2132
TAGGTTTAGA AGATTGATAA ACAGAACAAC AATGCAAGAA ACTACAAGGG TTATATAGCT	2192
TCCCCCTATA GAAACCTGGA GAAAGTTATG GTACATTGGT CCTTTCTACC ATTGCTAAAA	2252
TATAGTAGTA GTTTTGTATG TATACCCAAT TACAGGGGCC ATAATGTTAA GTTGTCTTCC	2312
TTCATAAATT ACGGCCATAT ATTTTCTTAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	2372
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAA	2400

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1989 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

## (iv) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA
- (B) SOUCHE: CV. viviani
- (D) STADE DE DEVELOPPEMENT: plantule
- (F) TYPE DE TISSU: plante entiere

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATGTATTCAA CTGTGTTTTA CACTTCAGTT CATCCATCCA CTTAGCTTT TTCAAGAAAG	60
CAGCTGCCTT TATTGATCTC TAAGGATTTT CCAACAGAGT TGTATCATTC TTTACCATGC	120
AGTAGAAGCT TGGAAAATGG TCAAATCAAG AAAGTCAAAG GTGTAGTAAA AGCCACAATA	180
GCTGAAGCTC CAGCAACTAT TCCTCCAAC GATTTAAAAA AGGTACCACA GAAGAAGCTG	240

AAAGTATTAG TAGCAGGTGG TGGGATTGGA GGATTAGTTT TTGCATTGGC GGCAAAGAAA	300
AGGGGATTTG ATGTGTTGGT ATTTGAGAGA GATTTAAGTG CTATTAGAGG AGAAGGACAA	360
TATAGAGGAC CAATTCAGAT ACAAAGCAAT GCATTGGCTG CTTTAGAAGC AATTGATATG	420
GATGTTGCTG AAGACATAAT GAATGCTGGT TGTATCACTG GTCAAAGGAT TAATGGTTTG	480
GTTGATGGTG TTTCTGGTAA CTGGTATTGC AAGTTTGATA CGTTTACTCC AGCCGTGGAA	540
CGCGGACTTC CTGTGACAAG AGTCATCAGC CGCATGACTT TGCAACAGAA CCTTGCACGT	600
GCCGTCGGGG AAGATATCAT TATGAATGAA AGTAATGTAG TGAAC TTGA GGATGATGGT	660
GAAAAGGTTA CTGTGACTCT TGAGGATGGA CAGCAATATA CAGGTGATCT TCTGGTTGGT	720
GCTGATGGCA TAAGGTCTAA GGTACGGACT AATTTGTTTC GACCCAGTGA TGTAAC TTAC	780
TCTGGCTACA CTTGTTACAC TGGGAATTGCA GATTTTGTTT CTGCTGATAT TGAGACAGTT	840
GGGTACCGAG TCTTTTTGGG CCACAAACAG TACTTTGTTT CTTGAGATGT GGGTGGAGGC	900
AAGATGCAGT GGTATGCATT TCACAATGAA CCAGCTGGCG GTGTGGATGA TCCAAACGGT	960
AAAAAGGCAA GATTGCTTAA AATATTTGAG GGGTGGTGTG ACAATGTTAT AGACCTATTA	1020
GTAGCCACAG ATGAAGATGC AATTCTTCGA CGTGACATCT ATGATAGACC GCCAACATTT	1080
AGTTGGGGAA AAGGTCGTGT TACATTGCTT GGGGACTCTG TCCATGCTAT GCAGCCTAAT	1140
TTGGGTCAAG GGGGATGCAT GGCCATAGAG GATAGCTATC AACTAGCACT GGAAC TTGAT	1200
AAAGCATTGA GCCGAAGCGC CGAGTCAGGA ACCCCTGTGG ATATCATCTC ATCTTTAAGG	1260
AGCTATGAAA GTTCTAGAAA ACTTCGAGTT GGAGTTATCC ATGGACTGGC TAGAATGGCT	1320
GCAATCATGG CATCAACTTA CAAGGCTTAT CTTGGTGTCTG GACTTGGTCC ATTATCATTT	1380
TTGACCAAGT TTAGGATACC ACATCCTGGA AGAGTTGGTG GAAGATTTTT TATTGACTTG	1440
GGAATGCCGC TTATGTTAAG CTGGGTTCTA GGAGGCAACG GGGAAAAGCT TGAAGGCAGA	1500
ATACAACATT GCAGGCTATC TGAGAAAGCA AATGACCAAT TGAGAAATTG GTTTGAAGAT	1560
GATGATGCTT TAGAGCGTGC TACTGATGCA GAGTGGCTAT TGCTTCCTGC CGGGAATAGC	1620
AATGCTGCTT TAGAACTCT CGTTTTAAGC AGAGATGAGA ACATGCCTTG CAATATTGGG	1680
TCTGTCTCAC ATGCAAACAT TCCTGGAAAA TCAGTTGTTA TACCTTTGCC TCAGGTGTCC	1740
GAAATGCACG CCCGGATATC CTACAAAGGT GGAGCATTTT TTGTAAC TGA TTTACGAAGT	1800
GAACATGGTA CCTGGATTAC GGATAACGAA GGCAGAAGAT ACCGAGCATC TCCAACTTC	1860
CCTACTCGCT TTCATCCATC AGATATTATT GAATTTGGTT CTGATAAAAA GGCAGCATTT	1920
CGCGTAAAGG TAATGAAATT TCCTCCAAAA ACTGCTGCAA AAGAAGAGCG TCAAGCAGTG	1980
GGGGCAGCT	1989

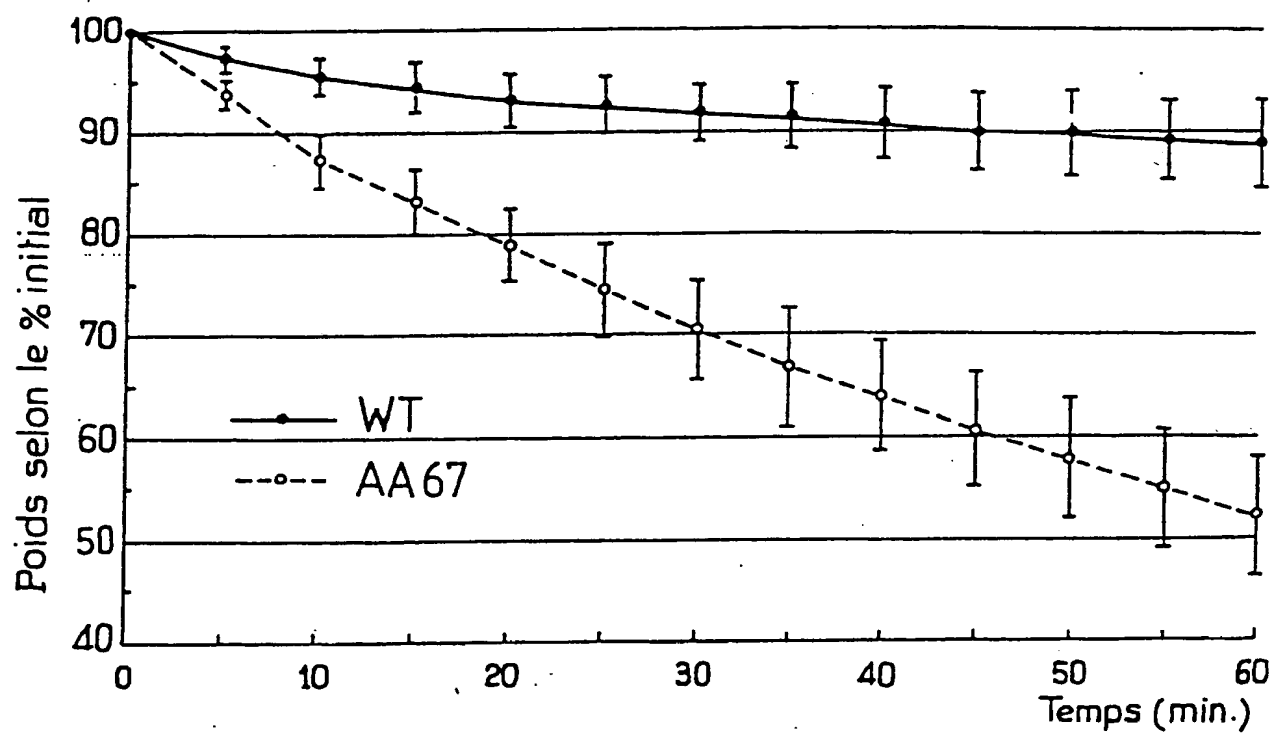


## REVENDICATIONS

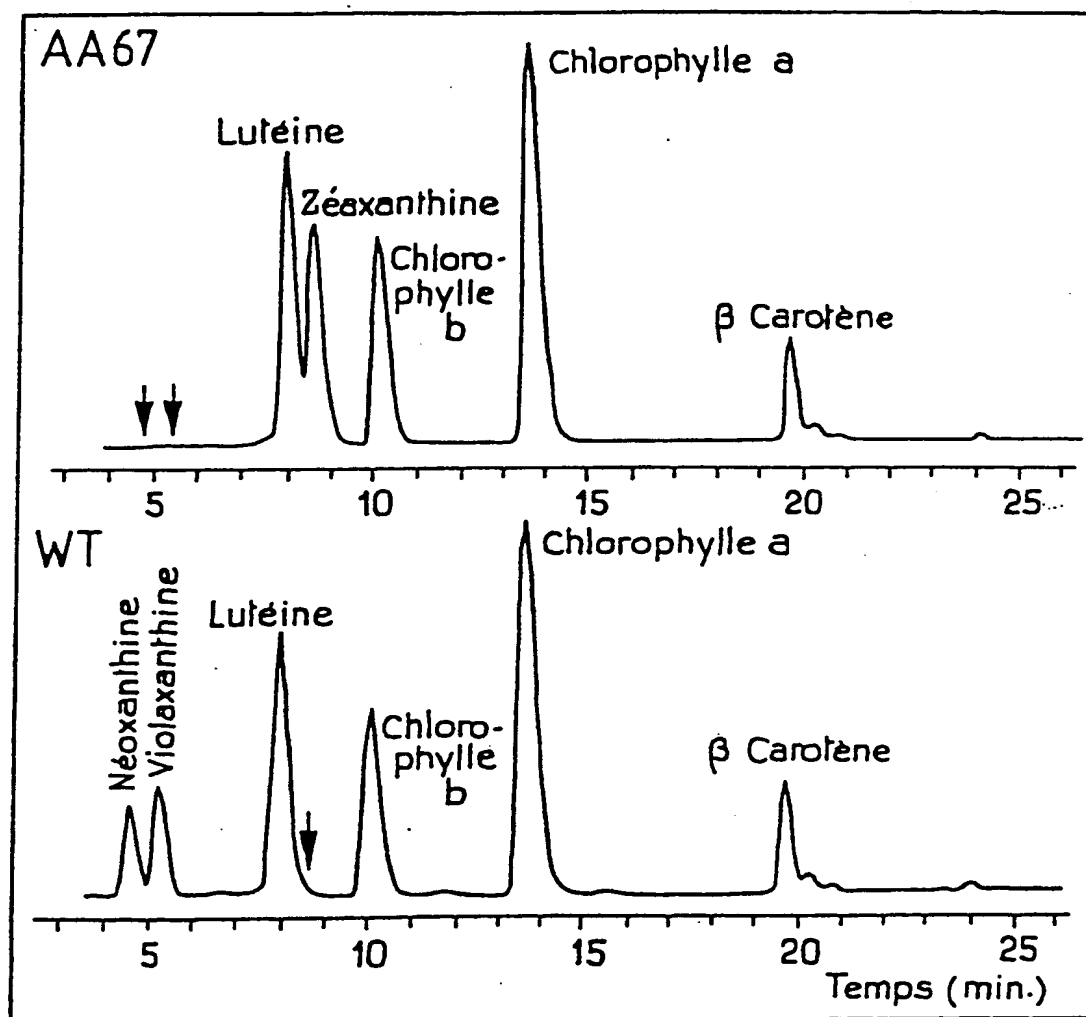
1. Fragment d'acide nucléique codant pour un enzyme impliqué dans la voie de biosynthèse de l'acide abscissique (ABA) chez les plantes.
- 5
2. Fragment selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'enzyme est une époxydase impliquée dans les deux premières étapes de la voie de biosynthèse de l'ABA.
- 10
3. Fragment selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que l'enzyme présente une activité d'époxydation de la zéoxanthine.
4. Fragment selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est isolé de Nicotiana Plumbaginifolia.
- 15
5. Fragment d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence de nucléotides telle que montrée dans l'identificateur de séquence (IDS) N° 1.
- 20
6. Fragment selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence codante allant du nucléotide n° 41 à 2029 de l'IDS N° 1.
- 25
7. Fragment selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comporte en outre la séquence leader allant du nucléotide n° 1 à 40 de l'IDS N° 1.
- 30
8. Fragment selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisé en ce qu'il comporte en outre la séquence de terminaison allant du nucléotide 2030 à 2400 de l'IDS N° 1.
9. Fragment selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comporte ladite séquence de terminaison augmentée d'une queue poly A à son extrémité 3'.

10. Fragment selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence complète de 2400 nucléotides telle que montrée sur l'IDS N° 1.
- 5            11. Fragment selon l'une des revendications 4 à 9 caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence complémentaire, homologue ou complémentaire de l'homologue de celle de la ou desdites séquence(s) de l'IDS N° 1.
- 10           12. Fragment d'acide nucléique capable de s'hybrider dans des conditions faiblement stringentes avec un fragment selon l'une des revendications 1 à 11 et codant pour une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse de l'ABA.

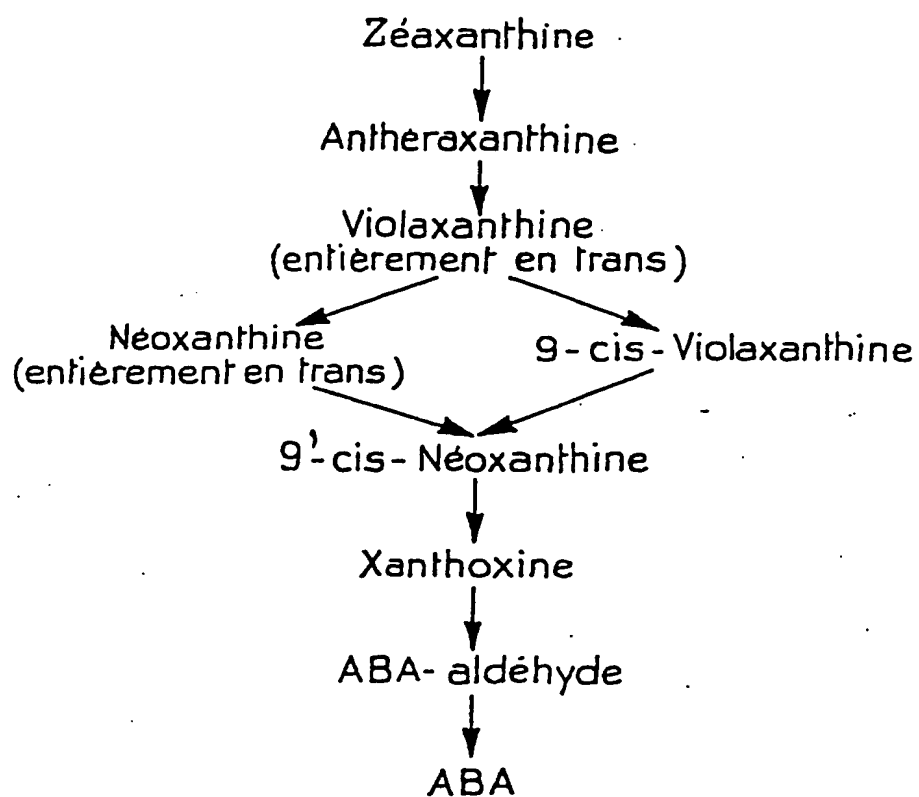
1 / 11

FIG. 1

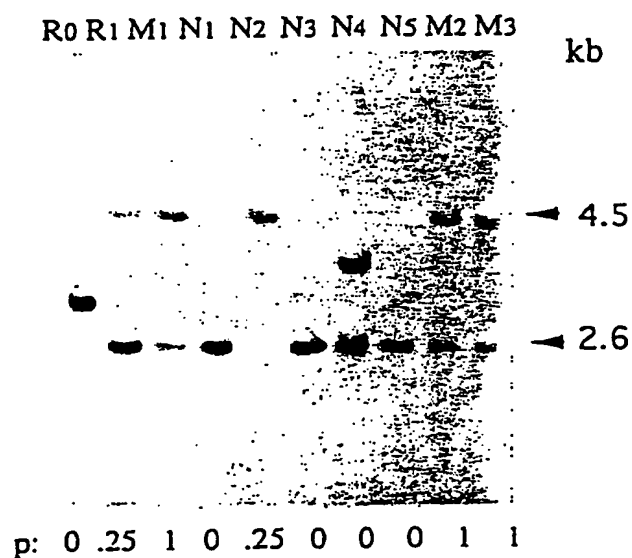
2 / 11

FIG. 2

3 / 11

FIG. 3

4 / 11

FIG\_4

5 / 11

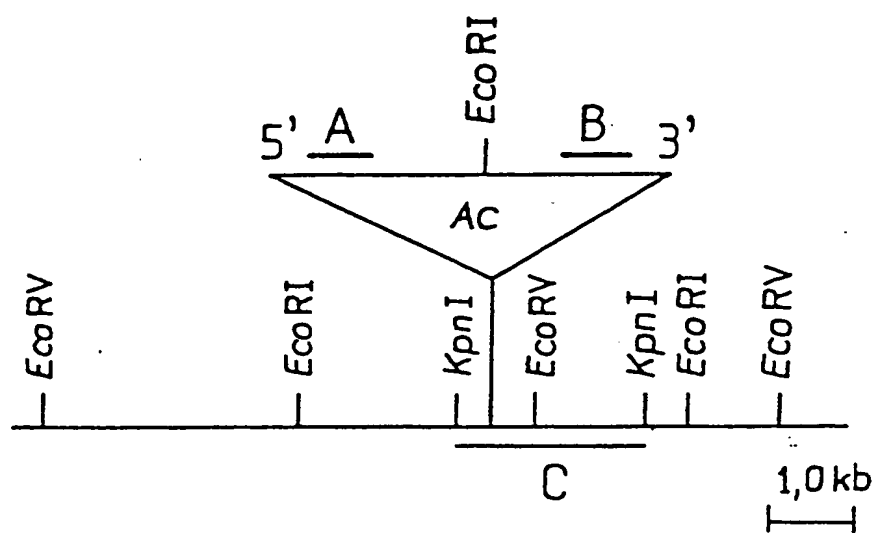
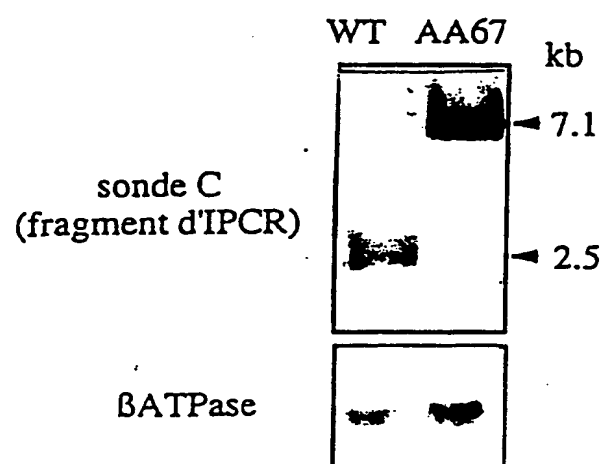


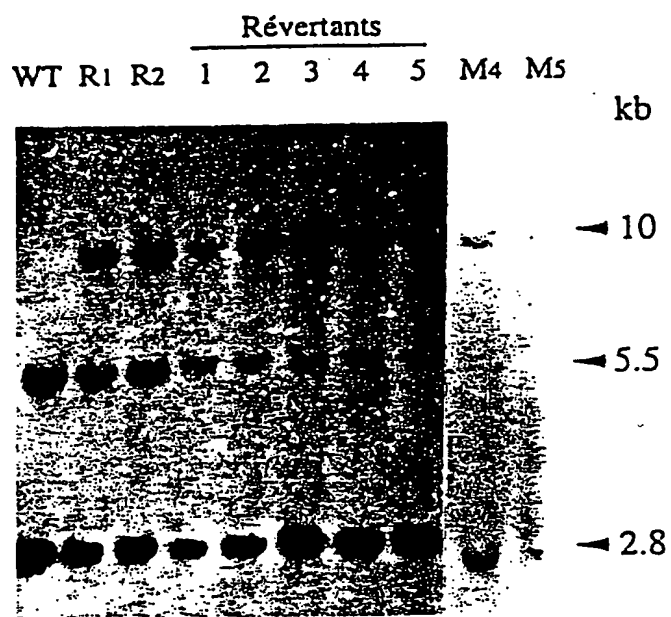
FIG. 5

6 / 11

FIG\_6



7 / 11



FIG\_7

8<sub>1</sub>/11

-40 TGAAGACTACACTCTTTCTTGAAGCTTGGGTTCAAGTAAAG

1 ATGTATTCAACTGTGTTTTTACACTTCAGTTCATCCACTTCAGCTTTTTCAGAAAG  
 1 M Y S T V F Y T S V H P S T S A F S R K

61 CAGCTGCCTTTATTGATCTCTAAGCATTTTCCACACAGAGTTGTATCATTTTACCATGC  
 21 Q L P L L I S K D F P T E L Y H S L P C

121 ACTAGAAGCTTGGAAATGGCTCAAAATCAAGAAAGTCAAGGTGTAGTAAAGCCACAATA  
 41 S R S L E N G Q I K K V K G V V K A T I

181 GCTGAAGCTCCAGCAACTATTCTCTCCAACTGATTTAAAAAGGTACCACAGAAAGCTG  
 61 A E A P A T I P P T D L K K V P Q K K L

241 AAAGTATTAGTAGCAGGTGGTGGGATTCGACGATTAGTTTTTTCATTGCGGCAAGAA  
 81 K V L V A G C G I G G L V F A L A A K K

301 AGCGGATTTGATGCTGTTGCTATTTTCAGACAGCATTTAAGTCTATTAGACGACAGACAA  
 101 R G F D V L V F E R D L S A I R G E G Q

361 TATAGAGGACCAATTACAGATACAAAGCAATGCATTGCGCTGCTTTAGAACCAATTGATATG  
 121 Y R G P I Q I Q S N A L A A L E A I D H

421 GATGTTGCTGAAGACATAATGAATGCTGCTGTTGCTATCACTGCTCAAGCATTAATGCTTTC  
 141 D V A E D I M N A C C I T C Q Q R I N C L

FIG. 8A

8<sub>2</sub>/11

481 GTTCATCGTCTTTCTCGTAACTCGTATTGCCAAGTTTTCGATACGTTTACTCCAGCCGCTCGAA  
161 V D G V S G N W Y C K F D T F T P A V E  
541 CGCGGACTTCCTGTGACAAAGACTCATCAGCCCGCATGACTTTCCAAACAGAACCTTCCACGT  
181 R G L P V T R V I S R H T L Q Q N L A R  
601 CCCGTCGGGCAACATATCATTAATCAATCAAAAGTAAATGTAAGTCAAACTTTGAGGATCATCGT  
201 A V G E D I I H N E S N V V N F E D D C  
661 GAAAGGCTTACTGTGACTCTTTCAGGATCGACACAGCAATATACAGCTGATCTTCTCGTTGCT  
221 E K V T V T L E D G Q Q Y T C D L L V G  
721 GCTGATCGCATAAAGCTCTAAAGCTACCGACTAAATTTGTTCCGACCCAGCTGATGTAACTTAC  
241 A D G I R S K V R T N L F G C P S D V T Y  
781 TCTGGCTACACTTGTTCACACTCGAATTGACAGATTTTGTTCTCCTCCTGATATTGACACAGTT  
261 S G Y T C Y T C I A D F V P A D I E T V  
841 GCGTACCGAGTCTTTTTCGGCCACAAACAGTACTTTGTTTCTTCAGATGTCGGTCCAGCC  
281 C Y R V F L G H K Q Y F V S S D V C C G  
901 AAGATCCAGTGGTATGCATTTTCACAATGAACCAAGCTCGCGCTGTCGATGATCCAAACGCT  
301 K M Q W Y A F H N E P A G G V D D P N C

FIG. 8B

8<sub>3</sub>/11

961 AAAAGGCAAGATTGCTTAAATATTTACGGCGTGTGACAATGTTATAGACCTATTA  
321 K K A R L L K I F E G W C D N V I D L L  
1021 GTAGCCACAGATGAAGATGCAATTCTTCGACGTGACATCTATGATAGACCGCCAAACATTT  
341 V A T D E D A I L R R D I Y D R P P T F  
1081 AGTTGGGAAAGGTCGTGTACATTGCTTGGGACTCTGTCCATGCTATGCAGCCTAAT  
361 S W G K C R V T L L C D S V H A H Q P N  
1141 TTGGGTCAAGCGCGATGCCATGCCCATAGAGGATAGCTATCAACTAGCACTGGAACTTGAT  
381 L G Q C C C H A I E D S Y Q L A L E L D  
1201 AAAGCATTGAGCCGAGCGCCGAGTCACGAAACCCTGTGGATATCATCTCTTTAAGG  
401 K A L S R S A E S G T P V D I I S S L R  
1261 AGCTATGAAGTTCTAGAAACTTCGAGTTGCGAGTTATCCATGCACTGCCCTAGAATGGCT  
421 S Y E S S R K L R V G V I H G L A R H A  
1321 GCAATCATGGCATCAACTTACAAAGCCTTATCTTGGTGTCCGACTTGGCTCCATTATCATTT  
441 A I M A S T Y K A Y L G V G L G P L S F

FIG. 8C

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

9  
1/11

1381 TTGACCAAGTTTAGGATACCCACATCCTGGAAGAGTTGCTGGAAGATTTTTTTATTGACTTG  
461 L T K F R I P H P G R V G G R F F I D L  
1441 GGAATGCCCGCTTATGTAAAGCTGGCTTCTAGGAGGCAACGGCGAAAGCTTGAAGGCAGA  
481 G M P L M L S W V L G G N G E K L E G R  
1501 ATACAACATTGCAGCGCTATCTGAGAAAGCCAAATGACCAATTCAGAAATTCGTTTGAAGAT  
501 I Q H C R L S E K A N D Q L R N W F E D  
1561 GATGATGCTTTAGAGCGTCTACTGATGCAGAGTGGCTATTGCTTCCTGCCGGGAATAGC  
521 D D A L E R A T D A E W L L L P A C N S  
1621 AATGCTGCTTTAGAAACTCTCGTTTTTAAGCAGAGATGAGAAATCCCTTCCAATATTGGG  
541 N A A L E T L V L S R D E N M P C N I G  
1681 TCTGCTCACATGCCAAACATTCCCTCGAAATCAAGTTGTTATACCTTTGCCCTCAGGTGTCC  
561 S V S H A N I P G K S V V I P L P Q V S  
1741 GAAATGCACGCCCGGATATCCTACAAAGCTGGAGCCATTTTTTGTAACTCATTTACGAAGT  
581 E H H A R I S Y K G G A F F V T D L R S  
1801 CAACATCGTACCTCGATTACCGGATAACGAAGCCAGAGATACCGAGCATCTCCAAACTTC  
601 E H G T W I T D N E G R R Y R A S P N F

FIG. 8 D

9<sub>2</sub>/11

1861 CCTACTCGCTTTCATCCATCAGATATATTGAAATTTGGTTCTCATAAAGGCAGCATTT  
621 P T R F H P S D I I E F C S D K K A A F.  
1921 CGCGTAAAGCTAATGAAATTTCTCTCCAAAACTGCTCCAAAGACAGCGTCAAGCAGTG  
641 R V K V H K F P P K T A A K E E R Q A V  
1981 GCGCCAGCTTGCAGAAATTCGGAGGTTTGGCCCTGATATAACGGCGGAAATTGTACAGCATTT  
661 C A A  
2041 TTATAGCAACAGCACAAACTCAGCCATTTAAATCAGCTAAATTTCTATACTGTAGGTTTA  
2101 GAAGATTGATAAACAGAACAAACAAATGCCAAGAACTACAGCGTTATATAGCTTCCCCCTA  
2161 TAGAAACCTCGAGAGAACTTATGCTACATTGCTCCTTTCTACCATTCCTAAATATAGTAG  
2221 TAGCTTTTGTATGTATACCCAAATTACAGCGCGCCATTAATGTTTCTCTCTTCATATAA  
2281 TTACGGCCATATATTTCTTAT(A) 58

FIG. 8E

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

WO 96/38566

10 / 11

a  
liaison à l'ADP repliée en  $\beta\alpha\beta$  xy-y-G-G--G---y--y (boucle) y-y-z  
Epoxydase (aa 81-109) KVLVAGGGIGGLVFALAA KKRGFV VLVFE

b

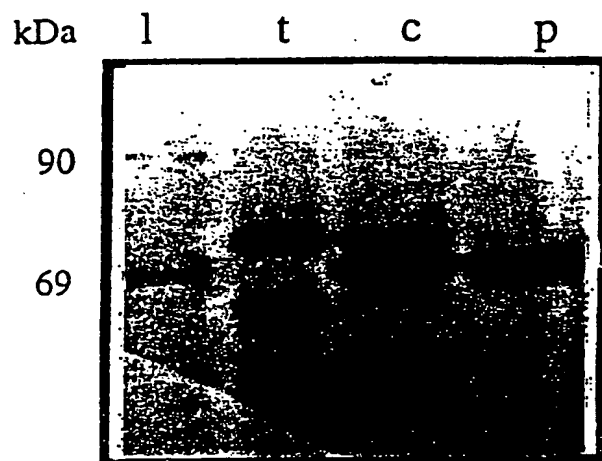
pcpB	TISPRWVI	GADGVRSRVRE	(185)
visa	MLTARLVI	GADGANSWLRN	(171)
ubiH	TLTGRLV	AADGTHSALAT	(168)
pheA	TIRAKYLI	GADGARSKVAA	(116)
nahG	EYRCDLLI	GADGIKSALRS	(170)
Epox.	QYTGDLLV	GADGIRSKVRT	(249)
consensus	--x---yy	GADG--S-yR-	
	A	A	

c

séquence consensus du site de liaison à FAD	T/M	----ywyYGd
liaison à FAD de PEBB (aa 277-287)	M	QHGRFLAGD
liaison à FAD de nahG (aa 304-314)	Y	VHGRVVLIGD
Epoxydase (aa 359-372)		TFSWGKGRVTLLGD
		#

FIG. 9

11/11

FIG\_10



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/00820

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/53 C12N15/52 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SYMPOSIUM ON MOLECULAR STRATEGIES FOR CROP IMPROVEMENT HELD AT THE 19TH ANNUAL UCLA SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, KEYSTONE, COLORADO, USA, APRIL 16-22, 1990. J CELL BIOCHEM SUPPL 0 (14 PART E). 1990. 356., XP002017523	1
Y	"CLONING OF MAIZE VIVIPAROUS 7 A GENE IN THE ABSCISIC ACID CAROTENOID BIOSYNTHETIC PATHWAY BY TRANSPOSON-TAGGING." voir abrégé R533 --- -/--	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 November 1996

Date of mailing of the international search report

15. 11. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/FR 96/00820

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, 1991, WASHINGTON US, pages 7496-7499, XP002017527 ROCK, C.D., ET AL.: "The aba mutant of Arabidopsis thaliana is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis" cited in the application see the whole document ---	1-12
X	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 22, pages 589-602, XP002017524 FRAY, R.G., ET AL.: "Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression" see the whole document ---	1
P,X	THE EMBO JOURNAL, vol. 15, no. 10, 15 May 1996, pages 2331-2342, XP002017525 MARIN, E., ET AL.: "Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of Nicotiana plumbaginifolia, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of Arabidopsis thaliana" see the whole document ---	1-12
P,X	WO,A,95 30005 (DEKALB GENETICS CORP ;UNIV YALE (US)) 9 November 1995 see the whole document ---	1
A	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1144, pages 97-101, XP002017526 GRUSZECKI, W.I., ET AL.: "LHCII, the major light-harvesting pigment-protein complex is a zeaxanthin epoxidase" see the whole document ---	1-12
A	THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 85, 1992, pages 213-221, XP000608930 ROUSSELIN, P., ET AL.: "Characterization of three hormone mutants of Nicotiana plumbaginifolia: evidence for a common ABA deficiency" see the whole document ---	1-12

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 96/00820

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EMBL SEQUENCE DATABASE. RELEASE 42, 6-FEB-1995. ACCESSION NO. T45502, XP002017528 NEWMAN, T., ET AL.: "8765 Arabidopsis thaliana cDNA clone 133D24T7" voir séquence</p> <p>-----</p>	12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/00820

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9530005	09-11-95	AU-A- 2371495 ZA-A- 9503474	29-11-95 10-04-96
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D nde Internationale No  
PCT/FR 96/00820

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 6 C12N15/53 C12N15/52 C12N15/82

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB:

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SYMPOSIUM ON MOLECULAR STRATEGIES FOR CROP IMPROVEMENT HELD AT THE 19TH ANNUAL UCLA SYMPOSIA ON MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, KEYSTONE, COLORADO, USA, APRIL 16-22, 1990. J CELL BIOCHEM SUPPL 0 (14 PART E). 1990. 356., XP002017523	1
Y	"CLONING OF MAIZE VIVIPAROUS 7 A GENE IN THE ABSCISIC ACID CAROTENOID BIOSYNTHETIC PATHWAY BY TRANSPOSON-TAGGING." voir abrégé R533  --- -/--	1-12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

**\* Catégories spéciales de documents cités:**

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 Novembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15. 11. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Maddox, A

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D nde Internationale No  
PCT/FR 96/00820

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, 1991, WASHINGTON US, pages 7496-7499, XP002017527 ROCK, C.D., ET AL.: "The aba mutant of Arabidopsis thaliana is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis" cité dans la demande voir le document en entier ---	1-12
X	PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 22, pages 589-602, XP002017524 FRAY, R.G., ET AL.: "Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression" voir le document en entier ---	1
P,X	THE EMBO JOURNAL, vol. 15, no. 10, 15 Mai 1996, pages 2331-2342, XP002017525 MARIN, E., ET AL.: "Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of Nicotiana plumbaginifolia, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of Arabidopsis thaliana" voir le document en entier ---	1-12
P,X	WO,A,95 30005 (DEKALB GENETICS CORP ;UNIV YALE (US)) 9 Novembre 1995 voir le document en entier ---	1
A	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1144, pages 97-101, XP002017526 GRUSZECKI, W.I., ET AL.: "LHCII, the major light-harvesting pigment-protein complex is a zeaxanthin epoxidase" voir le document en entier ---	1-12
A	THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, vol. 85, 1992, pages 213-221, XP000608930 ROUSSELIN, P., ET AL.: "Characterization of three hormone mutants of Nicotiana plumbaginifolia: evidence for a common ABA deficiency" voir le document en entier ---	1-12

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D    nde Internationale No  
PCT/FR 96/00820

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>EMBL SEQUENCE DATABASE. RELEASE 42, 6-FEB-1995. ACCESSION NO. T45502, XP002017528 NEWMAN, T., ET AL.: "8765 Arabidopsis thaliana cDNA clone 133D24T7" voir séquence -----</p>	12

### Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR 96/00820

Formulaire PCT/ISA/210 (annonces familiales de brevets) (juillet 1992)